

(12)特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19)世界知的所有権機関  
国際事務局



(43)国際公開日  
2002年5月30日 (30.05.2002)

PCT

(10)国際公開番号  
WO 02/42481 A1

- (51)国際特許分類: C12N 15/86, A61K 48/00 [CN/US]; 91801 カリフォルニア州 アルハンブラ サウスオリーブ アベニュー #23 241 California (US). 長谷川謙 (HASEGAWA, Mamoru) [JP/JP]; 〒305-0856 茨城県つくば市観音台1丁目25番11号 株式会社 ディナベック研究所内 Ibaraki (JP).
- (21)国際出願番号: PCT/JP01/10323
- (22)国際出願日: 2001年11月27日 (27.11.2001)
- (25)国際出願の言語: 日本語 (74)代理人: 清水初志, 外 (SHIMIZU, Hatushi et al.) ; 〒300-0847 茨城県土浦市卸町1-1-1 関鉄つくばビル6階 Ibaraki (JP).
- (26)国際公開の言語: 日本語
- (30)優先権データ: (74)代理人: 清水初志, 外 (SHIMIZU, Hatushi et al.) ; 〒300-0847 茨城県土浦市卸町1-1-1 関鉄つくばビル6階 Ibaraki (JP).
- 特願 2000-359374 2000年11月27日 (27.11.2000) JP
- (71)出願人(米国を除く全ての指定国について): 株式会社 ディナベック研究所 (DNAVEC RESEARCH INC.) [JP/JP]; 〒305-0856 茨城県つくば市観音台1丁目25番11号 Ibaraki (JP).
- (72)発明者; および (74)代理人: 清水初志, 外 (SHIMIZU, Hatushi et al.) ; 〒300-0847 茨城県土浦市卸町1-1-1 関鉄つくばビル6階 Ibaraki (JP).
- (75)発明者/出願人(米国についてのみ): 米満吉和 (YONEMITSU, Yoshikazu) [JP/JP]; 〒813-0043 福岡県福岡市東区名島5-31-3 Fukuoka (JP). 居石克夫 (SUEISHI, Katsuo) [JP/JP]; 〒815-0073 福岡県福岡市南区大池1-29-22 Fukuoka (JP). 福村正之 (FUKUMURA, Masayuki) [JP/JP]; 〒290-0158 千葉県市原市ちはら台4-55-1 Chiba (JP). 侯 晓剛 (HOU, Xiaogang)
- (81)指定国(国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (84)指定国(広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ヨーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:  
— 國際調査報告書

[続葉有]

(54) Title: PARAMYXOVIRUS VECTOR ENCODING ANGIOGENESIS GENE AND UTILIZATION THEREOF

(54)発明の名称: 血管新生遺伝子をコードするパラミクソウイルスベクターおよびその利用

(57) Abstract: A paramyxovirus vector encoding an angiogenesis gene. Use of the paramyxovirus vector makes it possible to efficiently transfer the angiogenesis gene into an individual tissue. FGF2 gene administered *in vivo* expresses the angiogenesis gene accompanied by no edema in an ischemic tissue, thereby preventing necrosis due to the ischemia. This vector is appropriately usable in gene therapy targeting ischemic tissues.

(57)要約:

本発明は、血管新生遺伝子をコードするパラミクソウイルスベクターおよびその利用を提供する。パラミクソウイルスベクターを用いることにより、個体組織に血管新生遺伝子を効率良く導入することが可能となった。インビボ投与で導入されたFGF2遺伝子は、虚血組織において浮腫を伴うことなく血管新生遺伝子を発現し、虚血による壊死を防止した。本発明のベクターは、虚血組織を対象とした遺伝子治療に好適に用いられる。

WO 02/42481 A1



2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

## 明細書

### 血管新生遺伝子をコードするパラミクソウイルスベクターおよびその利用

#### 技術分野

本発明は、血管新生遺伝子をコードするパラミクソウイルスベクターおよびその利用に関する。

#### 背景技術

近年、血管新生を誘導する増殖因子を用いた虚血疾患の治療に関する研究が進められている。例えば、心筋梗塞や急性虚血肢に対して、線維芽細胞増殖因子2 (FGF2) (Baffour, R. et al., J. Vasc. Surg. 16(2):181-91, 1992) や内皮細胞増殖因子 (endothelial cell growth factor; ECGF) (Pu, L. Q. et al., J. Surg. Res. 54(6):575-83, 1993) の投与による治療効果が調べられている。より最近では、血管内皮増殖因子／血管透過性因子 (vascular endothelial growth factor; VEGF / vascular permeability factor; VPF) が、心筋虚血および肢虚血の動物モデルにおいて、血管形成を促進することが示されている (Takeshita, S. et al., Circulation 90(5 Pt 2):II228-34, 1994; Takeshita, S. et al., J. Clin. Invest. 93(2):662-70, 1994)。

また、最近、血管新生を誘導する増殖因子を用いたヒト遺伝子治療の臨床試験が開始され、これを重症の虚血肢の血管新生治療に対して臨床応用する研究も進められている。内皮細胞特異的な増殖因子である血管内皮増殖因子／血管透過性因子 (VEGF/VPF) はこの目的にかなう治療遺伝子と見なされており、実際、プラスミドベクターを用いたヒトへの遺伝子導入において比較的良好な治療効果が報告されている (Baumgartner, I., et al., Circulation 97, 1114-1123 (1998); Isner, J. M., et al., J. Vasc. Surg. 28, 964-973 (1998))。しかしながら、

プラスミドを用いた筋肉への遺伝子導入および発現効率はさほど高くなく、VEGFの筋中遺伝子投与の有害な副作用や毒性レベルについては、現在のところほとんど報告がない。最近の報告によれば、トランスジェニック (Thurston, G., et al., Science 286, 2511-2514 (1999)) またはアデノウイルス (Thurston, G., et al., Nature Med. 6, 460-463 (2000)) によるVEGFの過剰発現が、遺伝子を導入された動物において異常な血管形成を起すこと、さらにプラスミドによる筋中へのVEGF遺伝子導入が、ヒトの虚血肢において一過的な浮腫を起すことが示されているが (Baumgartner, I., et al., Circulation 97, 1114-1123 (1998); Insner, J. M., et al., J. Vasc. Surg. 28, 964-973 (1998))、これらの詳細な機構は不明である。また、VEGFの過剰発現は血管新生シグナルのバランスを崩し、血管腫様の脆弱毛細管を形成する可能性が考えられる (Carmeliet, P., Nature Med. 6, 1102-1103 (2000))。また、VEGFをin vivoで血管壁へ遺伝子導入した場合、血管腫様の内皮増殖により新生内膜の顕著な肥厚をもたらし、赤血球の血管外遊出 (extravasation) を引き起こし得る (Yonemitsu, Y., et al., Lab. Invest. 75, 313-323 (1996))。またレトロウイルスを用いて心筋に恒常的にVEGFを過剰発現させた場合でも同様の病理所見が観察されている (Lee, R. J., et al., Circulation 102, 898-901 (2000))。また特に臨床適用を考えた場合、局所的に発現させたこれらの血管新生因子が全身の循環系に漏れ出すレベルは極めて重要な問題であり、予想外の血管新生の合併症による糖尿病性網膜症や腫瘍増殖が懸念される。

一方、主幹動脈が急性に閉塞することにより発症する急性重症虚血肢は主に血栓性閉塞に起因し、血管新生治療の対象となる重要な虚血疾患の一つである。急性重症虚血肢の後期治療の成績は極めて不良であり、多くの場合肢切断に至る。さらに肢切断に至った患者の生命予後も不良であり、1年生存率は50%と低い。プラスミドによる遺伝子発現レベルは低く、このようなより重篤な急性動脈閉塞などに対する有効性は未だ不明である。

## 発明の開示

本発明は、血管新生遺伝子をコードするパラミクソウイルスベクターおよびその用途を提供することを課題とする。より詳しくは、本発明は、血管新生遺伝子をコードするパラミクソウイルスベクター、該ベクターを含む血管新生組成物、および該ベクターを利用して虚血組織の血管新生を促進する方法を提供する。

本発明者らの予備的な研究によれば、急性重症虚血肢のマウスモデルにおいて、プラスミドをベースにしたVEGF165の遺伝子導入では救肢に成功しなかった（データ省略）。導入遺伝子をより強く発現させることにより、より良好な結果が得られるかを確かめるため、本発明者らは、様々な器官で高い効率で遺伝子を導入できることが示唆されている組み換えセンダイウイルス（SeV）を介した遺伝子導入により治療遺伝子を導入する研究を行った。実施例において本発明者らは、虚血肢治療のためのツールとして2つの組み換えSeVベクター、すなわちヒトVEGF165を発現するSeVベクター、および、蛋白質として投与した時に血管新生作用を示す増殖因子であることが知られているFGF2（bFGFとも言う）（Baffour, R. et al., J. Vasc. Surg. 16: 181-191 (1992)）に着目し、マウスFGF-2を発現するSeVベクターを構築して用いた。これらのベクターを用いて、（1）SeVを介した筋中遺伝子導入における導入遺伝子の発現レベルとカイネティクス、（2）血管新生因子の高発現が急性重症虚血肢の肢壊死を防げるか、若しくは逆に有害に作用するか、そして（3）筋中において高発現させた血管新生蛋白質が全身の循環系へ漏れ出すか否かについて実験を行った。

虚血モデルには、外腸骨動脈から膝上大腿動脈まで全てを抜去（重症虚血モデル）して得られるBALB/c nu/nuマウス下肢脱落モデル（auto-amputationモデル）、同操作後の生理的血管新生により下肢脱落に至らないC57BL/6マウス救肢モデル（limb salvageモデル）を用いた。ヒトVEGF165、マウスFGF2、またはルシフ

エラーゼを発現するベクター（それぞれ SeV-hVEGF165、SeV-mFGF2、または SeV-luciferase）を構築し、虚血手術2日前に大腿筋、下腿筋に投与し、手術後10日まで下肢の状態を観察した。

ルシフェラーゼ遺伝子を用いたマウス下肢骨格筋への遺伝子導入では、 $100\mu\text{g}$  のプラスミド投与での発現レベル（ヒト60kgに対し200mg：臨床使用量の25~50倍に相当）に比較して、SeVでは 5~120倍高い遺伝子発現が得られた。種々の培養細胞では、SeV-hVEGF165、SeV-mFGF2とともに  $50\sim500\text{ng}/10^5\text{ cells}/24\text{ hours}$  と高い蛋白の分泌を認めた。SeV-mFGF2の筋肉内投与は、非投与対照（ベースライン）に比べFGF2レベルを5~100倍に上昇させたのに対して、SeV-hVEGF165の投与では筋肉において限られた発現しか示さず（最大でもベースラインの2倍）、内因性VEGFの発現を顕著に増加させた。SeV-hVEGF165の投与においては、ベクター投与を受けた筋肉組織が投与後2日目には広汎な壊死に陥り、後肢の脱落を促進する結果となった。一方、SeV-mFGF2投与では内因性VEGFの発現を伴い、救肢において有意な治療効果が得られた。双方で血清中に有意なベクター由来蛋白の流出を認めなかつた ( $<5\text{ pg/ml}$ )。救肢モデルでは手術のみ、SeV-luciferase群、および SeV-mFGF2群において全て救肢されたが、SeV-hVEGF群だけは1/3以上の個体の下肢が脱落した。下肢脱落モデルではFGF2群でのみ高い救肢効果が得られ、他の群ではほとんどの下肢が脱落した。

本発明において、組み換えセンダイウイルスベクターの筋中投与が、導入遺伝子の発現を顕著に増強させることが実証された。組み換えセンダイウイルスベクターはプラスミドベクターに比べ 10~100倍以上高い発現を示したが、VEGF165を発現する組み換えセンダイウイルスベクターの *in vivo* 投与においては、マウスの急性重症虚血肢における肢脱落をかえって増悪化させることが明らかとなつた。SeV-hVEGF165の投与は浮腫を誘起させ（実施例4、図8）、虚血手術後の血流の回復を妨げた（実施例5、図11および12）。そして、虚血による肢脱落の比率を有意に増悪化させた（実施例5、図9および10）。これはVEGFの強い血管透

過性亢進作用が一因であると考えられる。これに対し、FGF2 を発現するセンダイウイルスベクターの投与は一定して高い治療効果を示した。どちらのモデルにおいても、全身の循環系に分泌された組み換え蛋白質は検出されないことから、他臓器への影響が少なく安全域が高いことが示唆された。これらの結果は、ヒトへの臨床適用において、特定の肢状態におけるVEGFの望ましくない効果に注意を払う必要があることを示している。そして、より広いレンジで安全性と治療効果を示す FGF2 の遺伝子治療が、安全な遺伝子治療系と成り得ることが示された。また本発明は、*in vivo* における治療遺伝子の導入における強力なツールであるSeVベクターの有効性を実証すると共に、急性重症虚血肢に対する臨床治療における利用を可能とする。

即ち、本発明は、血管新生遺伝子をコードするパラミクソウイルスベクターおよびその利用に関し、より具体的には、

- (1) 血管新生遺伝子を発現可能にコードするパラミクソウイルスベクター、
- (2) 血管新生遺伝子が線維芽細胞増殖因子2 (FGF2) である、(1) に記載のパラミクソウイルスベクター、
- (3) パラミクソウイルスがセンダイウイルスである、(1) に記載のパラミクソウイルスベクター、
- (4) F遺伝子を欠損している、(1) に記載のパラミクソウイルスベクター、
- (5) (1) に記載のパラミクソウイルスベクターまたは該ベクターを含む細胞、並びに薬学的に許容できる担体を含む、血管新生組成物、
- (6) 虚血組織を処置するための、(5) に記載の組成物、
- (7) 筋中投与用である、(5) に記載の組成物、
- (8) (5) から (7) のいずれかに記載の血管新生組成物を投与する工程を含む、血管新生を誘導する方法、に関する。

本発明により、(1)肢虚血が誘導する内因性VEGFは筋中に局在するよりむしろ全身循環系に拡散するのに対し、本発明のベクターを介したVEGF165の発現は全身

循環系には有意に漏出しない、(2)内因性FGF2の発現に比べ5~100倍高いレベルで外来性FGF2を発現させても全身循環系への有意な拡散は見られない、(3) FGF2のこのレベルの発現は内因性VEGFの発現を誘導し、肢の血流を顕著に増加させ有意な救肢効果を示す、そして(4) VEGF165の過剰発現はFGF2とは対照的に肢破壊を誘導する、ことが示された。これらの知見は、特にFGF2は臨床応用に適しており、急性重症肢虚血の処置における治療血管新生因子として広い安全域を持っていることを示唆している。また本発明は、肢虚血に対するVEGF165の遺伝子導入が深刻な有害効果をもたらし得ることを初めて明示するものである。

興味深いことに、肢虚血により誘導される内因性VEGFは筋中に濃縮されるのではなく、全身循環系に拡散した。虚血手術が筋肉および内皮細胞(EC)において内因性VEGFの発現を誘導することは知られていたが(Florkiewicz, R. Z. et al., J. Cell. Physiol. 162, 388-399 (1995))、本発明は、内因性VEGFが、局所的な血管新生ではなく全身的な血管新生反応を誘導する可能性を示す初めての実験データを開示する。AsaharaらはVEGFの全身投与は内皮前駆細胞(endothelial progenitor cells; EPCs)の移動性を上昇させることを示しており(Asahara, T, et al, EMBO J. 18, 3964-3972 (1999))、肢虚血に対する生理的反応による側肢血管(collateral vessels)の形成は、既存の血管から放出される増殖性ECによる局所的血管新生(Isner J. M., J. Clin. Invest. 106, 615-619 (2000))よりも、EPCを介した「血管新生様」の新血管形成("vasculogenesis-like" neovascularization)に、ある程度依存している可能性がある。虚血脉への遺伝子導入によるVEGFの誘導は有意な血流をもたらさず、肢脱落を起すことが判明したが、この場合、VEGFは「血管新生因子」ではなく、主に「血管透過因子」として作用しているのかも知れない。これは、筋肉の組織学的観察によりVEGF165群でより重篤な筋肉間浮腫が見られたことによっても支持される。

第二に、本発明によりFGF2の遺伝子治療はそれ自身のみで虚血脉の処置において効果を有しており、またin vivoにおける内因性VEGFの機能も関与していること

が示された。FGF2の遺伝子導入による筋中のVEGFのトータルな蛋白質濃度はVEGF遺伝子導入における場合と同等であるが、FGF2遺伝子治療自体は、VEGF遺伝子治療とは異なり十分な効果を示した。これらの知見は、虚血肢の治療に必要な血液を灌流させ、しかも血管漏出を起さないような成熟血管が形成されるには、VEGFだけでなくFGF2も必要であることを示唆している。VEGFにより誘導される未成熟血管の血管漏出を抑制する作用を持つ血管新生因子である angiopoietin-1 がこれに貢献している可能性も考えられる。

SeV-VEGF165は、*in vitro*においてSeV-FGF2と同様のレベルで遺伝子産物を分泌させることができることから、*in vivo* の筋中において、注入されたSeV-VEGF165が、なぜSeV-FGF2やSeV-luciferaseと同じような発現を示さないのかは完全には明らかではない。組織学的な解析と同様、レーザードップラー灌流像 (LDPI) 解析でも筋組織の強い破壊と血液の灌流の低下が示されたことから、VEGF165が誘導する浮腫などの組織破壊の結果として、例えばチューブリン (Moyer, S. A., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83, 5405-5409 (1986)) やホスホグリセレートキナーゼ (Ogino, T., et al., J. Biol. Chem. 274, 35999-36008 (1999)) などのSeVが媒介する転写の細胞内機構が障害される可能性が考えられる。あるいは、比較的低いレベルの内因性VEGF165遺伝子の発現（約 200pg/g muscle）が重症虚血筋では顕著に増加 (1,400pg/g muscle) するために、肢脱落が促進される可能性も考えられる。これらの結果は、筋中のVEGF濃度の増加は、例えベースラインの2倍程度の低レベルであるとしても、重症の肢虚血をもたらす可能性を強く示唆している。

血管新生はよく調和された過程であり、多数の因子が関与していると考えられている。これらの因子の中でもVEGFの生物学的機能は、その用量に高度に依存しており、アレルが1つ欠失しただけでも致命的な欠損をもたらす (Carmeliet, P. et al., Nature 380, 435-439 (1996))。血管の統合および成熟の全過程においてVEGFの持続的な発現が必要であり、一過的なVEGFの発現は短時間の血管新生反

応しか誘導せず (Pettersson, A. et al., Lab. Invest. 80, 99-115 (2000))、さらにVEGFが誘導する毛細管様構造は既存の血管とはほとんど連結しない (Springer, M. L., et al., Mol. Cell 2, 549-558 (1998))。従って、本発明の結果からは、十分なFGF2が存在しない場合に、筋中のVEGF濃度が2倍を上回ると、非常に有毒となる可能性が示唆される。これらを考え合わせると、治療的血管新生においてVEGFは臨床的に非常に高い可能性を持つことに変りはないが、VEGFの使用には、従来以上に注意を払うべきであることが示唆される。そして急性重症肢虚血の救肢における筋肉内へのFGF2遺伝子の導入は、安全で顕著な治療的効果を發揮することが実証された。

本発明において「パラミクソウイルスペクター」とは、パラミクソウイルスに由来し遺伝子を宿主細胞に導入するベクター（担体）を指す。本発明のパラミクソウイルスペクターはリボ核タンパク質 (RNP) であってもよく、また、感染力を持つウイルス粒子であってもよい。ここで「感染力」とは、組み換えパラミクソウイルスペクターが細胞への接着能および膜融合能を保持していることにより、接着した細胞の内部にベクター内部の遺伝子を導入することのできる能力を言う。本発明のパラミクソウイルスペクターは、複製能を有していてもよく、複製能を有さない欠損型ベクターであってもよい。「複製能を有する」とは、ウイルスペクターが宿主細胞に感染した場合、該細胞においてウイルスが複製され、感染性ウイルス粒子が產生されることを指す。複製能は、例えばサル腎臓由来細胞株LL C-MK2またはCV-1などを用いて調べることができる。

本明細書において、「組み換え」パラミクソウイルスペクターとは、遺伝子操作により構築されたパラミクソウイルスペクターまたはそれを増幅して得られるパラミクソウイルスペクターを言う。組み換えパラミクソウイルスペクターは、例えば、組み換えパラミクソウイルスcDNAを再構成して生成することができる。

本発明においてパラミクソウイルスとはパラミクソウイルス科に属するウイルスまたはその誘導体を指す。本発明を適用可能なパラミクソウイルスとしては、

例えばバラミクソウイルス科(*Paramyxoviridae*)のセンダイウイルス(Sendai virus)、ニューカッスル病ウイルス(Newcastle disease virus)、おたふくかぜウイルス(Mumps virus)、麻疹ウイルス(Measles virus)、RSウイルス(Respiratory syncytial virus)、牛痘ウイルス(rinderpest virus)、ジステンバーウイルス(distemper virus)、サルパラインフルエンザウイルス (SV5)、ヒトパラインフルエンザウイルス1,2,3型等が挙げられる。本発明のウイルスは、好ましくはバラミクソウイルス属 (*Paramyxovirus*) に属するウイルスまたはその誘導体である。本発明を適用可能なバラミクソウイルス属ウイルスとしては、例えばヒトパラインフルエンザウイルス 1型 (HPIV-1)、ヒトパラインフルエンザウイルス 3型 (HPIV-3)、ウシパラインフルエンザウイルス3型 (BPIV-3)、センダイウイルス(Sendai virus; マウスパラインフルエンザウイルス 1型とも呼ばれる)、およびサルパラインフルエンザウイルス10型 (SPIV-10)、並びにその他の多くのバラミクソウイルス属ウイルスが含まれる。本発明のバラミクソウイルスは、最も好ましくはセンダイウイルスである。これらのウイルスは、天然株、野生株、変異株、ラボ継代株、および人為的に構築された株などであり得る。DI粒子 (J. Virol. 68, 84 13-8417(1994)) 等の不完全ウイルスや、合成したオリゴヌクレオチド等も、本発明のウイルスペクターを製造するための材料として使用することができる。

バラミクソウイルスのウイルスタンパク質をコードする遺伝子としては、NP、P、M、F、HN、およびL遺伝子が含まれる。「NP、P、M、F、HN、およびL遺伝子」とは、それぞれヌクレオキヤプシド、ホスホ、マトリックス、フュージョン、ヘマグルチニン-ノイラミニダーゼ、およびラージ蛋白質をコードする遺伝子のことを指す。バラミクソウイルス亜科に属する各ウイルスにおける各遺伝子は、一般に次のように表記される。一般に、NP遺伝子は「N遺伝子」と表記されることもある。

バラミクソウイルス属	NP	P/C/V	M	F	HN	-	L
ルプラウイルス属	NP	P/V	M	F	HN	(SH)	L

モービリウイルス属 NP P/C/V M F H - L

例えばパラミクソウイルス科 (*Paramyxoviridae*) のレスピロウイルス (Respirovirus) に分類されるセンダイウイルスの各遺伝子の塩基配列のデータベースのアクセッション番号は、NP遺伝子については M29343, M30202, M30203, M30204, M51331, M55565, M69046, X17218、P遺伝子については M30202, M30203, M30204, M55565, M69046, X00583, X17007, X17008、M遺伝子については D11446, K02742, M30202, M30203, M30204, M69046, U31956, X00584, X53056、F遺伝子については D00152, D11446, D17334, D17335, M30202, M30203, M30204, M69046, X00152, X02131、HN遺伝子については D26475, M12397, M30202, M30203, M30204, M69046, X00586, X02808, X56131、L遺伝子については D00053, M30202, M30203, M30204, M69040, X00587, X58886を参照のこと。

本発明において「遺伝子」とは遺伝物質を指し、RNAおよびDNA等の核酸が含まれる。一般に、遺伝子は蛋白質をコードしてもよく、また蛋白質をコードしていくなくてもよい。遺伝子はリボザイムまたはアンチセンスRNAなどの機能的RNAをコードするものであってもよい。遺伝子は天然由来または人為的に設計された配列であり得る。また、本発明において「DNA」とは、一本鎖DNAおよび二本鎖DNAを含む。

本発明は、血管新生遺伝子をコードするパラミクソウイルスペクターおよびその用途を提供する。本発明者等は、血管新生遺伝子をコードするパラミクソウイルスペクターを *in vivo* で筋中に投与することにより、投与部位において導入遺伝子を高発現させることができることを実証した。本発明者等によるマウス虚血後肢の救肢実験では、血管新生遺伝子 (FGF2) をコードする組み換えパラミクソウイルスペクターの投与により、虚血組織の壊死が防止され、後肢の脱落を予防できることが示された。これらのベクターは虚血組織において効果的に血管新生を誘導し壊死を防止するために有用であり、本発明のベクターは虚血疾患に対する遺伝子治療に好適に用いられ得る。

また、本発明者等により、組み換えバラミクソウイルスペクターを利用して筋中に投与された遺伝子が、1～2週間にわたり持続的に発現することが示された。このことは、組み換えバラミクソウイルスペクターを利用して血管新生因子の遺伝子治療を行った場合に、持続的な治療効果を得ることができるという利点をもたらす。さらに、筋中投与された組み換えバラミクソウイルスペクターから発現された血管新生因子は、全身の循環系では検出されず、対象組織以外での望ましくない副作用を惹起しない点でも有用であることが示された。このようにバラミクソウイルスペクターが血管新生遺伝子の導入において様々な利点を有するという本発明により得られた知見は、特に、虚血組織を標的とした遺伝子治療などにおいて大きな進歩をもたらす可能性を示している。

また、安全性の面においても、ヒトへの病原性が否定されているため、バラミクソウイルスペクターはヒトへの遺伝子治療の臨床試験に好適に用いられうることが示唆される。第一に、プラスミドDNA等による外来遺伝子の発現は、多くの場合、導入したDNAの核局在化または核膜の消失が必要であることが、遺伝子発現の成功率を低下させる主要な障害になっている。しかし、例えばセンダイウイルスなどの場合、外来遺伝子の発現は、細胞質内において細胞性チューブリンおよび自身が持つRNAポリメラーゼ（L蛋白質）の両方によってウイルスの複製に伴って駆動される。これは、センダイウイルスが宿主の染色体と相互作用しないことを示しており、染色体異常による細胞の癌化および不死化などの安全面における問題が生じないと考えられる。第二に、センダイウイルスは齧歯類にとっては病原性で肺炎を生じることが知られているが、人に対しては病原性がない。これはまた、野生型センダイウイルスの経鼻的投与によって非ヒト霊長類において重篤な有害作用を示さないというこれまでの報告によっても支持されている (Hurwitz, J.L. et al., Vaccine 15: 533-540, 1997)。センダイウイルスのこれらの特徴は、センダイウイルスペクターが、ヒトの治療へ応用しうることを示唆し、センダイウイルスペクターが、血管新生遺伝子の遺伝子治療における有望な選択肢の

一つとなることを支持するものである。

本発明において血管新生遺伝子とは、血管新生 (angiogenesis) および／または血管形成 (vasculogenesis) を直接または間接に促進する活性を有する因子をコードする遺伝子を指す。該因子は蛋白質またはペプチドであってもよく、また機能的RNA (リボザイムやアンチセンスRNA) などの核酸であってもよい。血管新生蛋白質としては、例えば、酸性線維芽細胞増殖因子 (acidic fibroblast growth factor; aFGF)、線維芽細胞増殖因子 2 (fibroblast growth factor 2; FGF2) (塩基性線維芽細胞増殖因子 (bFGF) とも言われる)、血管内皮増殖因子 (vascular endothelial growth factor; VEGF)、アンгиオポイエチン (angiopoietins; Ang) (Ang-1およびAng-2を含む)、上皮増殖因子 (epidermal growth factor; EGF)、トランスフォーミング増殖因子 $\alpha$  (transforming growth factor- $\alpha$ ; TGF- $\alpha$ )、TGF- $\beta$ 、血小板由来内皮増殖因子 (platelet-derived endothelial cell growth factor; PD-ECGF)、血小板由来増殖因子 (platelet-derived growth factor; PDGF)、腫瘍壊死因子 $\alpha$  (tumor necrosis factor- $\alpha$ ; TNF- $\alpha$ )、肝細胞増殖因子 (hepatocyte growth factor; HGF)、インスリン様増殖因子 (insulin-like growth factor; IGF)、エリスロポイエチン (erythropoietin; EPO)、コロニーステミラント因子 (colony-stimulating factor; CSF)、マクロファージ-CSF (macrophage colony-stimulating factor; M-CSF)、顆粒球/マクロファージCSF (granulocyte-macrophage colony-stimulating factor; GM-CSF)、インターロイキン (interleukin; IL) -8、および一酸化窒素合成酵素 (nitric oxide synthase; NOS) が挙げられる (Klagsbrun, M. and D'Amore, P., A. Annu. Rev. Physiol. 53:217-39, 1991; Folkman, J. and Shing, Y., J. Biol. Chem. 267(16):10931-4, 1992; Symes, J. F. and Sniderman, A. D., Curr. Opin. Lipidol. 5(4):305-12, 1994)。

本発明において好ましい血管新生蛋白質としては、例えば、aFGF、FGF2、Ang-1、Ang-2、EGF、TGF- $\alpha$ 、TGF- $\beta$ 、PD-ECGF、PDGF、TNF- $\alpha$ 、HGF、IGF、EPO、CSF

、M-CSF、GM-CSF、IL-8、およびNOSなどが例示でき、これらから選択される蛋白質をコードする遺伝子を用いてベクターを作製することができる。

本発明に用いる血管新生蛋白質の中で特に好ましい蛋白質は、VEGFにより誘導される未熟な血管新生ではなく、新生した内皮細胞に間葉系細胞が接着し、壁細胞に分化して血管を取り囲む作用を有する蛋白質である。血管形成は3つのプロセス（脈管形成、血管新生、血管成熟）からなることが知られ、成熟した血管形成は種々の転写因子ノックアウト実験から複数の遺伝子の関与が知られている。特に転写因子SCL/tal-1は主として脈管形成に関与し、HIF-1、Id、ETS-1、HOXD<sub>3</sub>、COUP-TFII、MEF2C は血管新生に関与する。さらにLKLF (Lung krüppel-like factor) またはdHAND遺伝子をノックアウトすると壁細胞が発達できず胎生致死となることが知られている。

従って本発明に用いる血管新生遺伝子としては、LKLFおよびdHANDを含む、間葉系の未成熟な細胞において壁細胞の成熟に関与するところの転写因子を誘導する遺伝子であることがより好ましい。FGF2の刺激は、これらの転写因子の誘導に直接関与しているか、他の増殖因子であるアンギオポイエチンおよびHGF等を通じて間葉系の細胞の増殖分化を促していると考えられる。

血管新生蛋白質は、好ましくは、該蛋白質を分泌させる分泌シグナル配列を含む。但し、FGF2などは天然の典型的な分泌シグナルを持たなくとも細胞外に分泌される（実施例参照）。このような蛋白質は、必ずしも分泌シグナルを持つ必要はない。これらの血管新生因子をコードする遺伝子は、例えば塩基配列情報を基にして設計したプライマーを用いたPCRなどの公知の方法により調製することができる。本発明において用いられる特に好ましい血管新生因子としては、広範囲の発現レベルにおいて安定した治療効果を発揮するFGF2が例示できる（Abraham, J. A. et al., 1986, EMBO J. 5: 2523-2528; Moscatelli, D. A. et al., US4994559; Baird, A. et al., US5155214; Isner, J. M. US6121246; WO97/14307）。

ベクターの搭載する血管新生遺伝子は、遺伝子導入の標的個体と同じ種に由来

する遺伝子でなくとも効果を期待できるが、標的個体と同一種の遺伝子が好ましい。ベクターの搭載する血管新生遺伝子は、好ましくは哺乳動物の血管新生遺伝子であり、ヒトへの適用のためにはヒト遺伝子であることが好ましい。

本発明の血管新生遺伝子をコードするパラミクソウイルスベクターは、特に虚血組織の処置に有用である。すなわち、本発明のベクターを用いた血管新生遺伝子の遺伝子導入により、血管新生を促進し、虚血による壊死を防止することができる。本発明において虚血組織としては、虚血を起した組織および虚血を起しつつある組織であれば特に制限はない。このような組織には、例えば、筋肉、脳、腎臓、および肺が含まれる。本発明のベクター投与の対象となる虚血疾患には、例えば脳血管虚血、腎虚血、肺虚血、四肢の虚血、虚血性心筋症、および心筋虚血が挙げられる。本発明において、虚血組織の処置とは、虚血組織の治療または虚血障害の予防を指し、具体的には虚血組織の壊死の防止、虚血組織の生存、虚血組織における血管の新生の促進、組織再生、または虚血に起因する障害の防止・低減等を意味する。

本発明は、血管新生遺伝子をコードするパラミクソウイルスベクターを投与する工程を含む、血管新生を誘導する方法を提供する。また本発明は、血管新生遺伝子をコードするパラミクソウイルスベクターを投与することを特徴とする、虚血組織を処置する方法を提供する。投与対象となる個体に特に制限はなく、例えばヒトを含む所望の哺乳動物が挙げられる。また投与対象として、特に非ヒト哺乳動物が挙げられ、具体的には、例えばサル等を含む霊長類（原猿、真猿の広鼻猿、および狭鼻猿の類人猿などを含む）、マウス、ラット、モルモットを含むげっ歯類、およびウシ、イヌ、ネコ、ウマ、ヒツジ、ウサギ等が含まれる。本発明のベクターを用いれば、これらの動物に対する虚血治療が可能であり、あるいはヒト虚血治療のモデルとして利用することもできる (Morinaga, K. et al., 1987, J. Vasc. Surg. 5: 719-730; Itoh, H. et al., 1994, Atherosclerosis 110: 259-270)。

本発明の血管新生を誘導する方法は、具体的には以下を含む。〔1〕血管新生遺伝子をコードするパラミクソウイルスベクターまたは該ベクターを含む細胞を投与する工程を含む、血管新性を誘導する方法、〔2〕血管新生遺伝子が線維芽細胞増殖因子2 (FGF2) である、〔1〕に記載の方法、〔3〕投与が筋中投与である、〔1〕または〔2〕に記載の方法、〔4〕パラミクソウイルスがセンダイウイルスである、〔1〕から〔3〕のいずれかに記載の方法。また本発明の虚血組織を処置する方法は、具体的には以下を含む。〔1〕血管新生遺伝子をコードするパラミクソウイルスベクターまたは該ベクターを含む細胞を投与する工程を含む、虚血組織を処置する方法、〔2〕血管新生遺伝子が線維芽細胞増殖因子2 (FGF2) である、〔1〕に記載の方法、〔3〕投与が筋中投与である、〔1〕または〔2〕に記載の方法、〔4〕パラミクソウイルスがセンダイウイルスである、〔1〕から〔3〕のいずれかに記載の方法。

投与はインビボであってもエクスピボであってもよい。インビボ投与の場合は、血管新生遺伝子をコードするパラミクソウイルスベクターを筋肉注射、皮下注射、カテーテル投与等の当業者に公知の投与経路により注入することができる。エクスピボ投与の場合は、予め体外で細胞にこのベクターを導入する。その後、ベクターを導入した細胞を筋肉注射、皮下注射、カテーテル投与等により個体内に注入する。エクスピボ投与においてベクターを導入する細胞は、投与個体と異種または同種であってよいが、好ましくは同種、より好ましくは投与個体から採取した細胞である。さらに最も好ましくは、血管内皮細胞を形成または血管内皮細胞に分化し得る細胞すなわち血管内皮前駆細胞を含む、骨髓または血液由来の細胞である。薬学的有効量の本発明のベクターを投与することにより、投与組織において血管新生を誘導することができる。これにより、例えば脳、心臓、腎臓、肺、および四肢等の虚血において、組織の壊死および脱落を防止する治療が可能である。

また、本発明は、虚血組織を処置するための、血管新生遺伝子をコードするパ

ラミクソウイルスベクターの用途および使用を提供する。具体的には、本発明は

、

〔1〕虚血組織を処置するための、血管新生遺伝子をコードするパラミクソウイルスベクター、

〔2〕血管新生遺伝子が線維芽細胞増殖因子2〔FGF2〕である、〔1〕に記載のベクター、

〔3〕筋中投与用である、〔1〕または〔2〕に記載のベクター、

〔4〕パラミクソウイルスがセンダイウイルスである、〔1〕から〔3〕のいずれかに記載のベクター、を提供する。また本発明は、上記パラミクソウイルスベクターを含む、虚血組織を処置するための組成物を提供する。この組成物は、上記パラミクソウイルスベクター以外に、薬学的に許容される所望の担体を含んでよい。例えば本発明のベクターを生理的溶液と組み合わせて注射剤として、あるいは固体または半固体（ゲル）と組み合わせて体内埋め込み型製剤として製剤化して用いることができる。

本発明において血管新生遺伝子の導入に用いるパラミクソウイルスベクターとしては、特に制限はない。好適なパラミクソウイルスベクターとして、例えば、複製能を有し、自立的に増殖するようなベクターが挙げられる。例えば、一般に天然型パラミクソウイルスのゲノムは、3'の短いリーダー領域に続き、N（ヌクレオキヤブシド）、P（ホスホ）、M（マトリックス）、F（フェージョン）、HN（ヘマグルチニン-ノイラミニダーゼ）、およびL（ラージ）蛋白質をコードする6つの遺伝子が並んでおり、短い5'トレイラー領域を他端に有する。これと同様の構造を有するゲノムを設計することにより、自律複製可能な本発明のベクターを製造することができる。また、ゲノム内に外来遺伝子を挿入することにより、外来遺伝子を発現するベクターを製造することができる。なお、本発明のパラミクソウイルスベクターにおいては、ウイルス遺伝子の配置は野生型ウイルスから改変されていてもよい。

また、本発明に用いるバラミクソウイルスペクターとしては、野生型バラミクソウイルスが持つ遺伝子のいずれかを欠損したものであってもよい。例えば、センダイウイルスペクターを再構成させる場合、NP、P/CおよびL遺伝子から作られる蛋白質群がトランスに必要だと考えられているが、該蛋白質群をコードする遺伝子自体は、本発明のウイルスペクターに必ずしも含まれている必要なはい。例えば、該蛋白質群をコードする遺伝子を有する発現ベクターを、ベクターゲノムをコードする発現ベクターと共に宿主細胞にトランスフェクションすることにより、ベクターの再構成を行うことができる。また、該蛋白質群をコードする遺伝子を有する宿主細胞にベクターゲノムをコードする発現ベクターを導入し、該宿主細胞から該蛋白質群を供給して再構成を行ってもよい。これらの蛋白質群のアミノ酸配列は、ウイルス由来の配列そのままでなくとも、核酸の導入における活性が天然型のそれと同等かそれ以上ならば、変異を導入したり、あるいは他のウイルスの相同遺伝子で代用してもよい。

また、バラミクソウイルスペクターが細胞に伝播してゆくためには、M、FおよびHN遺伝子から作られる蛋白質群が必要だと考えられているが、バラミクソウイルスペクターをRNPとして調製する場合は、これらの蛋白質は必要ない。RNPに含まれるゲノムに、M、FおよびHN遺伝子が含まれていれば、宿主に導入された時に、これらの遺伝子産物が生産され、感染性のあるウイルス粒子が形成される。感染性ウイルスを产生するRNPベクターとしては、例えばN、P、M、F、HN、およびL遺伝子をコードするウイルスゲノムRNAと、N蛋白質、P蛋白質、およびL蛋白質とを含むRNPが挙げられる。このようなRNPを細胞内に導入すると、N蛋白質、P蛋白質、およびL蛋白質の働きによりウイルスゲノムが発現、複製され、感染性ウイルスペクターが増幅する。

RNPを細胞に導入するには、例えばリボフェクトアミンやポリカチオニックリボソームなどと共に複合体を形成させて導入することが可能である。具体的には、種々のトランスフェクション試薬が利用できる。例えば、DOTMA (Boehringer)、S

uperfect (QIAGEN #301305)、DOTAP、DOPE、DOSPER (Boehringer #1811169) などが挙げられる。エンドソーム中での分解を防ぐため、クロロキンを加えることもできる (Calos, M.P., 1983, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80: 3015)。複製型ウイルスの場合、產生されたウイルスは、培養細胞、鶏卵、個体（例えばマウスなどの哺乳動物）などに再感染させて増幅または継代することができる。

また、M、Fおよび／またはHN遺伝子が含まれていないパラミクソウイルスペクターも、本発明のパラミクソウイルスペクターとして好適に用いることができる。このようなウイルスペクターの再構成は、例えば、欠損している遺伝子産物を外来的に供給することにより行うことができる。このようにして製造されたウイルスペクターは、野生型ウイルスと同様に宿主細胞に接着して細胞融合を起こすが、細胞に導入されたベクターゲノムはこれらのいずれかの遺伝子を欠損しているため、最初と同じような感染力を持つ娘ウイルス粒子は形成されない。このため、一回限りの遺伝子導入力を持つ安全なウイルスペクターとして有用である。ゲノムから欠損させる遺伝子としては、特にF遺伝子および／またはHN遺伝子が挙げられる。遺伝子の欠損とは、その遺伝子の機能が実質的に失われることをいい、その遺伝子が蛋白質をコードする場合においては、その野生型蛋白質と同等の機能を有する蛋白質が発現しないことを言う。例えば、その遺伝子が転写されないこと、loss-of-function変異体であること、または欠失していることなどであつてよい。好ましくは、遺伝子の欠損とはその遺伝子のコード領域の少なくとも一部が、より好ましくは全部が欠失していることである。例えば、F遺伝子が欠損しているベクターは、好ましくはF蛋白質のコード領域の一部、より好ましくは全部を欠失しているベクターである。本発明のF遺伝子欠損ベクターは、より好ましくは、そのネガティブ鎖ゲノムにおいて欠損したF遺伝子の3'隣接部位のスタートシグナル配列をさらに欠損している。これにより、欠損部位からの必要のないポリペプチドの発現を抑制することができる。欠損部位に必要なポリペプチドをコードするオープンリーディングフレーム (ORF) が存在する場合には、部位特異

的変異導入等によりそのORFを除去することが好ましい（後述）。

F遺伝子を欠損したベクターの製造においては、例えば、F遺伝子が欠損した組み換えパラミクソウイルスベクターゲノムを発現するプラスミドを、F蛋白質の発現ベクターならびにNP、P/CおよびL蛋白質の発現ベクターと共に宿主細胞にトランسفエクションすることにより、ウイルスベクターの再構成を行うことができる（国際公開番号W000/70055およびW000/70070）。また、例えば、F遺伝子が染色体に組み込まれた宿主細胞を用いて製造することもできる。これらの蛋白質群を外から供給する場合、そのアミノ酸配列はウイルス由来の配列そのままでなくとも、核酸の導入における活性が天然型のそれと同等かそれ以上ならば、変異を導入したり、あるいは他のウイルスの相同遺伝子で代用してもよい。

また、ベクターゲノムが由来するウイルスのエンベロープ蛋白質とは異なる蛋白質をベクターのエンベロープに含むベクターを作製することもできる。このようなタンパク質に特に制限はない。例えば、他のウイルスのエンベロープタンパク質、例えば水疱性口内炎ウイルス（VSV）のGタンパク質（VSV-G）を挙げることができる。本発明のパラミクソウイルスベクターは、VSV-Gタンパク質などのように、ゲノムが由来するウイルス以外のウイルスに由来するエンベロープタンパク質を含むシュードタイプウイルスベクターが含まれる。

また、本発明のパラミクソウイルスベクターは、例えば、エンベロープ表面に特定の細胞に接着しうるような接着因子、リガンド、受容体等の蛋白質、あるいはこれらの蛋白質を細胞外領域に有し、ウイルスエンベロープ由来のポリペプチドを細胞内領域に有するキメラタンパク質などを含むものであってもよい。これにより、特定の組織を標的とするベクターを作り出すこともできる。これらはウイルスゲノムにコードされていてもよいし、ウイルスベクターの再構成時に、ウイルスゲノム以外の遺伝子（例えば別の発現ベクターまたは宿主染色体などに含まれる遺伝子）の発現により供給されてもよい。

また、本発明のウイルスベクターは、例えば免疫原性を低下させるために、ま

たはRNAの転写効率や複製効率を高めるために、ベクターに含まれるウイルス遺伝子が改変されたものであってもよい。具体的には、例えば複製因子であるNP遺伝子、P/C遺伝子およびL遺伝子の少なくとも一つを改変し、転写または複製の機能を高めることが考えられる。また、構造体蛋白質の1つであるHN蛋白質は、赤血球凝集素であるヘマグルチニン(hemagglutinin)活性とノイラミニダーゼ(neuraminidase)活性との両者の活性を有するが、例えば前者の活性を弱めることができれば、血液中でのウイルスの安定性を向上させることが可能であろうし、例えば後者の活性を改変することにより、感染能を調節することも可能である。また、膜融合に関わるF蛋白質を改変することにより、膜融合能を調節することもできる。また、例えば、細胞表面の抗原分子となりうるF蛋白質やHN蛋白質の抗原提示エピトープ等を解析し、これを利用して抗原提示能を弱めたパラミクソウイルスベクターを作製することもできる。

また本発明におけるパラミクソウイルスベクターとしては、アクセサリー遺伝子が欠損したものであってよい。例えばSeVのアクセサリー遺伝子の1つであるV遺伝子をノックアウトすることにより、培養細胞における遺伝子発現や複製は障害されることなく、マウス等の宿主に対するSeVの病原性が顕著に減少する(Kato, A. et al., 1997, J. Virol. 71:7266-7272; Kato, A. et al., 1997, EMBO J. 16:578-587; Curran, J. et al., WO01/04272, EP1067179)。このような弱毒化ベクターは、*in vivo* または*ex vivo*における遺伝子導入用ウイルスベクターとして特に好適である。

本発明のウイルスベクターは、ゲノムRNA中に血管新生遺伝子をコードする。外来遺伝子を含む組み換えパラミクソウイルスベクターは、上記のパラミクソウイルスベクターゲノムに外来遺伝子を挿入することによって得られる。外来遺伝子としては、ベクター導入の標的とする組織(虚血組織等)において発現させたい所望の血管新生遺伝子を用いることができる。外来遺伝子は天然型蛋白質をコードする遺伝子であってもよく、また天然型蛋白質と同等の機能を有する蛋白質を

コードする限り、欠失、置換または挿入により天然型蛋白質を改変した蛋白質をコードする遺伝子であってもよい。例えば、遺伝子治療などを目的とする場合には、該ウイルスペクターのゲノムをコードするDNA（ウイルスペクターDNA）に対象となる疾患の治療用遺伝子を挿入する。ウイルスペクターDNAに外来遺伝子を導入する場合は、例えば、センダイウイルスペクターDNAにおいては、転写終結(E)配列と転写開始(S)配列との間などに、6の倍数の塩基数を有する配列を挿入することが望ましい (Calain P. and Roux L., 1993, J. Virol., 67(8), 4822-4830)。外来遺伝子は、ウイルスの各遺伝子 (NP、P、M、F、HN、およびL遺伝子) の前および/または後ろに挿入することができる。前後の遺伝子の発現を妨げないようするため、外来遺伝子の前または後ろに適宜 E-I-S配列（転写開始配列ー介在配列ー転写終結配列）またはその部分を挿入し、各遺伝子の間にE-I-S配列を配置する。あるいは、IRESと共に外来遺伝子を挿入し得る。

挿入した外来遺伝子の発現量は、外来遺伝子の上流に付加する転写開始配列の種類により調節することができる (W001/18223)。また、遺伝子挿入の位置、および遺伝子の前後の塩基配列により調節しうる。例えば、センダイウイルスにおいては、挿入位置がウイルスゲノムのネガティブ鎖RNAの3'端に近いほど(野生型ウイルスのゲノム上の遺伝子配置においては、NP遺伝子に近いほど)、挿入された遺伝子の発現量が高い。外来遺伝子の高い発現を得るためにには、外来遺伝子をNP遺伝子の上流（ネガティブ鎖においては3'側）またはNP遺伝子とP遺伝子の間など、ネガティブ鎖ゲノムにおいて上流領域に挿入することが好ましい。逆に、挿入位置がネガティブ鎖RNAの5'端に近いほど(野生型ウイルスのゲノム上の遺伝子配置においては、L遺伝子に近いほど)、挿入された遺伝子の発現量が低くなる。外来遺伝子の発現を低く抑えるためには、例えばネガティブ鎖の最も5'側、すなわち野生型ウイルスゲノムにおいてはL遺伝子の下流（ネガティブ鎖においてはL遺伝子の5'隣接部位）、またはL遺伝子の上流（ネガティブ鎖においてはL遺伝子の3'隣接部位）に外来遺伝子を挿入する。このように、外来遺伝子の挿入位置は、該

遺伝子の所望の発現量を得るために、また前後のウイルスタンパク質をコードする遺伝子との組み合わせが最適となる様に適宜調節することができる。例えば、高力価ウイルスペクターの投与による血管新生遺伝子の高発現が毒性を示す場合は、投与するウイルス力価を制限することができる他、例えばベクターにおける血管新生遺伝子の挿入位置をネガティブ鎖のなるべく5'側に設定したり、転写開始配列を効率の低いものにするなどして、個々のウイルスペクターからの発現レベルを低く抑えることで適切な治療効果が得られるようにすることも可能である。

外来遺伝子を容易に挿入できるようにするために、挿入部位にクローニングサイトを設計することができる。クローニングサイトは、例えば制限酵素の認識配列とすることができます。ゲノムをコードするベクターDNA中の当該制限酵素部位に外来遺伝子断片を挿入することができる。クローニングサイトは、複数の制限酵素認識配列を有する、いわゆるマルチクローニングサイトとしてもよい。また、本発明のベクターは、このように挿入した以外に位置に他の外来遺伝子を保持していてもよい。このような外来遺伝子としては制限はなく、別の血管新生遺伝子であってもよく、また、その他の遺伝子であってもよい。

外来遺伝子を有する組み換えセンダイウイルスペクターは、例えば、Hasan, M. K. et al., J. Gen. Virol. 78: 2813-2820, 1997, Kato, A. et al., 1997, EMBO J. 16: 578-587及びYu, D. et al., 1997, Genes Cells 2: 457-466の記載に準じて、次のようにして構築することができる。

まず、所望の外来遺伝子のcDNA塩基配列を含むDNA試料を用意する。DNA試料は、25ng/ $\mu$ l以上の濃度で電気泳動的に单一のプラスミドと確認できることが好ましい。以下、外来遺伝子を、NotI部位を利用してウイルスゲノムをコードするDNAに挿入する場合を例にとって説明する。目的とするcDNA塩基配列の中にNotI認識部位が含まれる場合は、部位特異的変異挿入法などを用いて、コードするアミノ酸配列を変化させないように塩基配列を改変し、NotI部位を予め除去しておくこ

とが好ましい。この試料から所望の遺伝子断片をPCRにより増幅回収する。増幅された断片の両端がNotI部位とし、さらに一端にセンダイウイルスの転写終結配列(E)、介在配列(I)及び転写開始配列(S)(EIS配列)のコピーを付加するために、NotI制限酵素切断部位配列及び転写終結配列(E)、介在配列(I)及び転写開始配列(S)と目的遺伝子の一部の配列を含むプライマー対として、フォワード側(センス鎖)合成DNA配列及びリバース側(アンチセンス鎖)合成DNA配列(プライマーセット)を作成する。

例えば、フォワード側合成DNA配列は、NotIによる切断を保証するために5'側に任意の2以上のヌクレオチド(好ましくはGCGおよびGCCなどのNotI認識部位由来の配列が含まれない4塩基、更に好ましくはACTT)を選択し、その3'側にNotI認識部位gcggccgcを付加し、さらにその3'側にスペーサー配列として任意の9塩基または9に6の倍数を加えた数の塩基を付加し、さらにその3'側に所望のcDNAの開始コドンATGからこれを含めてORFの約25塩基相当の配列を付加した形態とする。最後の塩基はGまたはCとなるように該所望のcDNAから約25塩基を選択してフォワード側合成オリゴDNAの3'の末端とすることが好ましい。

リバース側合成DNA配列は5'側から任意の2以上のヌクレオチド(好ましくはGCGおよびGCCなどのNotI認識部位由来の配列が含まれない4塩基、更に好ましくはACTT)を選択し、その3'側にNotI認識部位gcggccgcを付加し、さらにその3'側に長さを調節するための挿入断片のオリゴDNAを付加する。このオリゴDNAの長さは、NotI認識部位gcggccgcを含め、cDNAの相補鎖塩基配列と後述するセンダイウイルスに由来するセンダイウイルスゲノムのE I S塩基配列の合計が6の倍数になるように塩基数を設計する(いわゆる「6のルール(rule of six)」; Kolakofski, D. et al., J. Virol. 72:891-899, 1998; Calain, P. and Roux, L., J. Virol. 67:4822-4830, 1993; Calain, P. and Roux, L., J. Virol. 67: 4822-4830, 1993)。さらに挿入断片の3'側にセンダイウイルスのS配列の相補鎖配列、好ましくは5'-CTTCACCCCT-3'(配列番号:1)、I配列、好ましくは5'-AAG-3'、E配

列の相補鎖配列、好ましくは5'-TTTTCTTACTACGG-3'（配列番号：2）、さらにその3'側に所望のcDNA配列の終止コドンから逆に数えて約25塩基相当の相補鎖の最後の塩基がGまたはCになるように長さを選択して配列を付加し、リバース側合成オリゴDNAの3'の末端とする。

PCRは、例えば、ExTaqポリメラーゼ（宝酒造）を用いる通常の方法を用いることができる。好ましくはVentポリメラーゼ（NEB）を用いて行い、増幅した目的断片はNotIで消化した後、プラスミドベクターpBluescriptのNotI部位に挿入する。得られたPCR産物の塩基配列をシークエンサーで確認し、正しい配列のプラスミドを選択する。このプラスミドから挿入断片をNotIで切り出し、ゲノムcDNAを含むプラスミドのNotI部位にクローニングする。またプラスミドベクターpBluescriptを介さずにNotI部位に直接挿入し、組み換えセンダイウイルスcDNAを得ることも可能である。

例えば、組み換えセンダイウイルスゲノムcDNAであれば、文献記載の方法に準じて構築することができる（Kato, A. et al., EMBO J. 16: 578-598, 1997, Hasan, M.K. et al. J. Gen. Virol. 78: 2813-2820, 1997; Yu, D. et al., Gene s Cells 2: 457-466, 1997; Li, H. O. et al., J. Virology 74, 6564-6569, 2000）。例えば、まずNotI制限部位を有する18bpのスペーサー配列（5'-(G)-CGGCC GCAGATCTTCACG-3'）（配列番号：3）を、クローニングされたセンダイウイルスゲノムcDNA（pSeV(+))のリーダー配列とN-タンパク質をコードする配列の5'末端との間の隣接遺伝子座に挿入し、デルタ肝炎ウイルスのアンチゲノム鎖（antigenomic strand）由来の自己開裂リボザイム部位を含むプラスミドpSeV18<sup>b</sup>(+)を得る（Hasan, M. K. et al., 1997, J. General Virology 78: 2813-2820）。pSeV18<sup>b</sup>(+)のNotI部位に外来遺伝子断片を挿入し、所望の外来遺伝子が組み込まれた組み換えセンダイウイルスcDNAを得ることができる。

このようにして作製した組み換えパラミクソウイルスペクターDNAを試験管内または細胞内で転写させ、ウイルスのL、P、およびNPタンパク質の共存下でRNP

を再構成させると、このRNPを含むウイルスベクターを生成させることができる。本発明は、血管新生遺伝子をコードする本発明のパラミクソウイルスベクターのゲノムを転写および複製する蛋白質の共存下、該ゲノムをコードするDNAを細胞内で転写させる工程、および生成したパラミクソウイルスベクターを回収する工程を含む、該ベクターの製造方法を提供する。パラミクソウイルスベクターのゲノムを転写および複製する蛋白質としては、例えばN、L、およびP蛋白質である。また本発明は、該DNAからなる、本発明のパラミクソウイルスベクター製造用DNAを提供する。また本発明は、本発明のパラミクソウイルスベクターを製造するための、該ベクターのゲノムをコードするDNAの使用に関する。ウイルスベクターDNAからのウイルスの再構成は公知の方法に従って行うことができる（国際公開97/16539号；国際公開97/16538号；Durbin, A.P. et al., 1997, *Virology* 235: 323-332; Whelan, S.P. et al., 1995, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 8388-8392; Schnell, M.J. et al., 1994, *EMBO J.* 13: 4195-4203; Radecke, F. et al., 1995, *EMBO J.* 14: 5773-5784; Lawson, N.D. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 4477-4481; Garcin, D. et al., 1995, *EMBO J.* 14: 6087-6094; Kato, A. et al., 1996, *Genes Cells* 1: 569-579; Baron, M.D. and Barrett, T., 1997, *J. Virol.* 71: 1265-1271; Bridgen, A. and Elliott, R.M., 1996, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 15400-15404）。これらの方法により、パラインフルエンザ、水疱性口内炎ウイルス、狂犬病ウイルス、麻疹ウイルス、リンダーベストウイルス、センダイウイルスなどを含む所望のパラミクソウイルスベクターをDNAから再構成させることができる。ウイルスベクターDNAにおいて、F遺伝子、HN遺伝子、および/またはM遺伝子を欠失させた場合には、そのままでは感染性のウイルス粒子を形成しないが、宿主細胞に、これら欠失させた遺伝子および/または他のウイルスのエンベロープ蛋白質をコードする遺伝子などを別途、導入し発現させることにより、感染性のウイルス粒子を形成させることが可能である。

例えば、ベクターDNAを細胞内に導入する方法には、次のような方法、①目的の

細胞が取り込めるようなDNA沈殿物を作る方法、②目的の細胞による取りこみに適し、かつ細胞毒性の少ない陽電荷特性を持つDNAを含む複合体を作る方法、③目的の細胞膜に、DNA分子が通り抜けられるだけに十分な穴を電気パルスによって瞬間に開ける方法などがある。

②としては、種々のトランスフェクション試薬が利用できる。例えば、DOTMA (Boehringer)、Superfect (QIAGEN #301305)、DOTAP、DOPE、DOSPER (Boehringer #1811169) などが挙げられる。①としては例えばリン酸カルシウムを用いたトランスフェクション法が挙げられ、この方法によって細胞内に入ったDNAは貧食小胞に取り込まれるが、核内にも十分な量のDNAが入ることが知られている (Graham, F.L. and Van Der Eb, J., 1973, Virology 52: 456; Wigler, M. and Silverstein, S., 1977, Cell 11: 223)。ChenおよびOkayamaはトランスファー技術の最適化を検討し、1) 細胞を共沈殿物のインキュベーション条件を 2~4% CO<sub>2</sub>、35°C、15~24時間、2) DNAは直鎖状より環状のものが活性が高く、3) 沈殿混液中のDNA濃度が 20~30 μg/mlのとき最適な沈殿が得られると報告している (Chen, C. and Okayama, H., 1987, Mol. Cell. Biol. 7: 2745)。②の方法は、一過的なトランスフェクションに適している。古くはDEAE-デキストラン (Sigma #D-9885 M.W. 5 × 10<sup>5</sup>) 混液を所望のDNA濃度比で調製し、トランスフェクションを行う方法が知られている。複合体の多くはエンドソームの中で分解されてしまうため、効果を高めるためにクロロキンを加えることもできる (Calos, M.P., 1983, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80: 3015)。③の方法は電気穿孔法と呼ばれる方法で、細胞選択性がないという点で①や②の方法に比べて汎用性が高い。効率はパルス電流の持続時間、パルスの形、電界（電極間のギャップ、電圧）の強さ、バッファーの導電率、DNA濃度、細胞密度の最適条件下で良いとされている。

以上、3つのカテゴリーの中で②の方法は操作が簡便で多量の細胞を用いて多数の検体を検討することができるので、本発明においては、トランスフェクション試薬が適している。好適には Superfect Transfection Reagent (QIAGEN, Cat

No. 301305)、または DOSPER Liposomal Transfection Reagent (Boehringer Mannheim, Cat No. 1811169) が用いられるが、これらに限定されない。

cDNAからの再構成は具体的には次のようにして行うことができる。

24穴から6穴程度のプラスチックプレートまたは100mmペトリ皿上で、10%ウシ胎児血清(FCS)および抗生物質(100 units/ml ベニシリンGおよび100 $\mu$ g/ml ストレプトマイシン)を含む最少必須培地(MEM)を用いてサル腎臓由来細胞株LLC-MK2を70~80%コンフルエントになるまで培養し、例えば1 $\mu$ g/ml psoralen(ソラレン)存在下UV照射処理を20分処理で不活化した、T7ポリメラーゼを発現する組み換えワクシニアウイルスvTF7-3(Fuerst, T.R. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83: 8122-8126, 1986、Kato, A. et al., Genes Cells 1: 569-579, 1996)を2 PFU/細胞で感染させる。ソラレンの添加量およびUV照射時間が適宜調整することができる。感染1時間後、2~60 $\mu$ g、より好ましくは3~5 $\mu$ gの上記の組み換えセンダイウイルスcDNAを、全長センダイウイルスゲノムの生成に必要なトランスクレプションに作用するウイルスタンパク質を発現するプラスミド(24-0.5 $\mu$ gのpGEM-N、12-0.25 $\mu$ gのpGEM-P、および24-0.5 $\mu$ gのpGEM-L、より好ましくは例えれば1 $\mu$ gのpGEM-N、0.5 $\mu$ gのpGEM-P、および1 $\mu$ gのpGEM-L)(Kato, A. et al., Genes Cells 1: 569-579, 1996)と共にSuperfect(QIAGEN社)を用いたリボフェクション法等によりトランスクレプションする。トランスクレプションを行った細胞は、所望により100 $\mu$ g/mlのリファンビシン(Sigma)及びシトシンアラビノシド(AraC)、より好ましくは40 $\mu$ g/mlのシトシンアラビノシド(AraC)(Sigma)のみを含む血清不含のMEMで培養し、ワクシニアウイルスによる細胞毒性を最少にとどめ、ウイルスの回収率を最大にするように薬剤の最適濃度を設定する(Kato, A. et al., 1996, Genes Cells 1: 569-579)。トランスクレプションから48~72時間程度培養後、細胞を回収し、凍結融解を3回繰り返して細胞を破碎した後、LLC-MK2細胞にトランスクレプションして培養する。培養3~7日後に培養液を回収する。エンベロープ蛋白質をコードする遺伝子を欠損した複製能を持たないウイルス

ベクターを再構成させるには、エンベロープタンパク質を発現するLLC-MK2細胞をトランスフェクションに使用するか、またはエンベロープ発現プラスミドと共にトランスフェクションすればよい。また、トランスフェクションを行った細胞にエンベロープタンパク質を発現するLLC-MK2細胞を重層して培養することによって欠損型ウイルスベクターを増幅することもできる（国際公開番号W000/70055およびW000/70070参照）。培養上清に含まれるウイルス力価は赤血球凝集活性(HA)を測定することにより決定することができる。HAは「endo-point 希釈法」(Kato, A. et al., 1996, *Genes Cells* 1: 569-579; Yonemitsu, Y. & Kaneda, Y., Hemaggulutinating virus of Japan-liposome-mediated gene delivery to vascular cells. Ed. by Baker AH. Molecular Biology of Vascular Diseases. Method in Molecular Medicine: Humana Press: pp. 295-306, 1999)により決定することができる。混入し得るワクシニアウイルスvTF7-3を除去するために、得られた尿液試料を適宜希釈（例えば $10^6$ 倍）して、鶏卵で再増幅させることができる。再増幅は、例えば3回以上繰り返すことができる。得られたウイルスストックは-80°Cで保存することができる。

ウイルスベクターが再構成する限り、再構成に用いる宿主細胞は特に制限されない。例えば、サル腎由来のLLCMK2細胞、CV-1細胞、ハムスター腎由来のBHK細胞などの培養細胞、ヒト由来細胞等を使うことができる。また、大量にセンダイウイルスベクターを得るために、上記の宿主から得られたウイルスベクターを発育鶏卵に感染させ、該ベクターを増幅することができる。鶏卵を使ったウイルスベクターの製造方法は既に開発されている（中西ら編,(1993),「神経科学研究の先端技術プロトコールIII, 分子神経細胞生理学」, 厚生社, 大阪, pp.153-172）。具体的には、例えば、受精卵を培養器に入れ9~12日間 37~38°Cで培養し、胚を成長させる。ウイルスベクターを尿膜腔へ接種し、数日間卵を培養してウイルスベクターを増殖させる。培養期間等の条件は、使用する組み換えセンダイウイルスにより変わり得る。その後、ウイルスを含んだ尿液を回収する。尿液からのセ

ンダイウイルスベクターの分離・精製は常法に従って行うことができる（田代眞人、「ウイルス実験プロトコール」，永井、石浜監修，メジカルビュー社，pp.68-73，(1995)）。また、次に述べるF欠失センダイウイルスの大量生産には、トリプシン耐性の細胞（例えばLLCMK2など）が好ましい。

F遺伝子を欠失したセンダイウイルスベクターの構築と調製は、例えば以下のように行うことができる（国際公開番号 WO00/70055 および WO00/70070参照）。

#### 1. 外来遺伝子搭載用F欠失型センダイウイルスゲノムcDNAの構築

センダイウイルス (SeV) の全長ゲノムcDNA、pSeV18<sup>+</sup> b(+) (Hasan, M. K. et al., J. Gen. Virol. 78, 2813-2820, 1997) (「pSeV18<sup>+</sup> b(+)」は「pSeV18<sup>+</sup>」ともいう) をSphI/KpnIで消化してフラグメント (14673bp) を回収し、pUC18にクローニングしてプラスミドpUC18/KSとする。F欠損部位の構築はこのpUC18/KS上で行う。F遺伝子の欠損はPCR-ライゲーション方法の組み合わせで行ない、結果としてF遺伝子のORF (ATG-TGA=1698bp) を除いてatgcatgccggcagatga (配列番号：4) で連結し、F欠失型SeVゲノムcDNA (pSeV18<sup>+</sup>/ΔF) を構築する。PCR法としては、Fの上流にはforward: 5'-gtttagtactgcaagagc (配列番号：5)、reverse: 5'-tttgccggcatcatgttcccaaggggagagtttgcaacc (配列番号：6)、F遺伝子の下流にはforward: 5'-atgcattgcggcagatga (配列番号：7)、reverse: 5'-tgggtgaatgagaaatcagc (配列番号：8) のプライマー対を用い、得られたPCR産物をEcoT22Iで連結する。このようにして得られたプラスミドをSacIとSalIで消化して、F欠損部位を含む領域の断片 (4931bp) を回収してpUC18にクローニングし、pUC18/dFSSとする。このpUC18/dFSSをDraIIIで消化して断片を回収し、pSeV18<sup>+</sup>のF遺伝子を含む領域のDraIII断片と置き換え、ライゲーションしてプラスミドpSeV18<sup>+</sup>/ΔFを得る。

なお、この構造はF遺伝子のEIS配列 (SeV特異的配列、E; end, I; intergenic, S; start) が残存し、下流のF遺伝子のORFは除かれているものの、この部位の連結に用いたプライマー由来の5アミノ酸ペプチドが発現する可能性のある構造

になっている。

F遺伝子の欠損位置への外来遺伝子の挿入は、pUC18/dFSSのF欠失部位にある制限酵素 NsiI および NgoMIV 部位を利用して行なう。このためには、例えば外来遺伝子断片をNsiI-tailedプライマーおよびNgoMIV-tailedプライマーで増幅すればよい。

例えば実際にEGFP遺伝子を搭載したcDNA (pSeV18<sup>+</sup>/ΔF-GFP) を構築する場合には、まずEGFP遺伝子のPCRによる増幅を行なう。EGFP遺伝子断片の塩基数を6の倍数 (Hausmann, S. et al., RNA 2, 1033-1045, 1996) に合わせるため、5'末端は NsiI-tailedプライマー (5'-atgcatatggtgatcggtttggcagtac／配列番号：9)、3'末端はNgoMIV-tailedプライマー(5'-tgccggctattattacttgtacagctcgtc／配列番号：10) を用いてPCRを行う。PCR産物を制限酵素MsIとNgoMIVで消化してゲルから断片を回収し、pUC18/dFSSのF欠失部位にあるNsiIとNgoMIVという制限酵素部位に連結し、シークエンスを確認する。ここからEGFP遺伝子を含むDraIII断片を回収し、pSeV18<sup>+</sup>のF遺伝子を含む領域のDraIII断片と置き換え、ライゲーションしてpSeV18<sup>+</sup>/ΔF-GFPを得る。

NP遺伝子の前の位置への外来遺伝子の挿入は、pSeV18<sup>+</sup>/ΔF或いはpSeV18<sup>+</sup>/ΔF-GFPの制限酵素NotIの認識部位を利用して行なう。ただし、pSeV18<sup>+</sup>/ΔFの場合は、欠失したF遺伝子位置に連結に用いたプライマー由来の5アミノ酸ペプチドが発現する可能性のある構造になっており、またpSeV18<sup>+</sup>/ΔF-GFPの場合はGFPが共発現するので、必要であればそのペプチド及びGFPが共発現する可能性のない遺伝子の構築を行う。そのためには下記の様に行なう。

pSeV18<sup>+</sup>/ΔF-GFPをSalIとNheIで消化してF欠損部位を含む領域の断片 (6288bp) を回収し、Litmus38 (New England Biolabs, Beverly, MA) にクローニングし、LitmusSalINheIfrg/ΔF-GFPとする。欠損させたF遺伝子上流のEIS配列を含むGFP遺伝子の欠損はInverse PCR法により行なう。すなわち、GFP遺伝子上流で制限酵素SexAIの認識配列をデザインしたreverseプライマー (5'-gtttaccagggtggagag-

ttttgcaaccaaggcac／配列番号：11）とGFP遺伝子下流で制限酵素SexAIの認識配列をデザインしたforwardプライマー（5'-cttcacctggtaacaaggcacatcatggatgg／配列番号：12）でPCRを行ない、目的の大きさの断片（10855 bp）を切り出してそのままライゲーションを行ない、欠損させたF遺伝子上流のEIS配列を含むEGFP遺伝子を欠失させる。

ただし、この場合、プライマーデザイン上のSexA1に挟まれた配列15bpが余分に挿入されている。そこで、プラスミドを大腸菌SCS110株にトランスフォームして調製し（SexA1はメチル化の影響を受け切断出来なくなるのでdcm<sup>-</sup>/dam<sup>-</sup>のSCS110株を利用する）、制限酵素SexA1で消化後、1628bp及び9219bpの2つの遺伝子断片を回収してライゲーションを行ない、余分な15 bpを欠失させ、6の倍数でF遺伝子上流のEIS配列を含むEGFP遺伝子を欠失させたLitmusSalI/NheIfrg/ΔF（△5aa）を調製する。このプラスミドをSalI及びNheIで消化して断片を回収し、pSeV18<sup>+</sup>のF遺伝子を含む領域のSalI/NheI断片と置き換え、ライゲーションしてプラスミドpSeV18<sup>+</sup>/ΔF（△5aa）を得る。

このプラスミドへの外来遺伝子挿入は、例えばNP遺伝子の前に位置する制限酵素NotIの認識配列を利用して行う。

## 2. hFGF2遺伝子搭載F欠失型センダイウイルスゲノムcDNAの構築

ヒトの FGF2 (hFGF2) cDNAの取得には種々の方法があるが、例えば、患者本人の了承を得て採取したヒト大伏在静脈から分離した血管平滑筋細胞よりRT-PCRにてcDNAを分離し、pBluescriptSK+ (Stratagene, La Jolla, CA) のHindIII (5'末端)、EcoRI (3'末端) にサブクローニングして調製することができる。その際、hFGF2 cDNAの遺伝子配列はAbrahamらの報告 (Abraham, J.A. et al., EMB0 J. 5 (10), 2523-2528 , 1986) を参照することができる。

NP遺伝子の前に位置する制限酵素NotIの位置にhFGF2遺伝子を挿入するために、hFGF2遺伝子の3'端側にSeV特異的配列 (EIS配列) を付加して両端にNotI認識配列を有するフラグメントを調製すればよい。具体的には、上記 hFGF2 cDNAを鑄

型にして、開始コドンを含むN末端側プライマー（5'-atccgcggccgccaaagttcactt atggcagccggagcatcaccacgtccccgccttgcccaggatggcggcagcggcgcc／配列番号：13）および終止コドン領域とEIS配列とを含むC末端側プライマー（5'-atccgcg gccgcgtgaacttcaccctaagttttcttactacggtcagctttagcagacattggaagaaaaagtat agc／配列番号：14）を用いてPCRを行ない、NotI消化後、pBluescriptSK+（Stratagene, La Jolla, CA)のNotI部位にサブクローニングしてpBS-hFGF2を調製する。塩基配列を確認し、得られた遺伝子に変異がある場合は、例えば、QuickChange<sup>TM</sup> Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene, La Jolla, CA)を利用してKitに記載の方法に従って目的の配列に修正する。pBS-hFGF2をNotIで消化後、hFGF2 cDNAを含む断片をpSeV18<sup>+</sup>/ΔF（△5aa）のNP遺伝子の前に位置するNotI部位に挿入し、hFGF2遺伝子搭載F欠失型センダイウイルスゲノムcDNA pSeV18<sup>+</sup>hFGF2/ΔF（△5aa）を構築する。pSeV18<sup>+</sup>hFGF2/ΔF（△5aa）は、以後pSeV18<sup>+</sup>hFGF2/ΔFとも表記する。

### 3. F発現プラスミドの構築

センダイウイルスのF遺伝子（SeV-F）の発現には、Cre DNAリコンビナーゼにより遺伝子産物を誘導発現されるように設計されたプラスミドpCALNdLw (Cre/loxP 誘導型発現プラスミド；Arai, T. et al., J. Virol. 72(2), 1115-1121, 1998) を利用することができる。pUC18/KSをStyI及びBstUIで消化し、SeV-F遺伝子を含む断片（1783bp）を切り出し、平滑末端処理後、pCALNdLwのユニークサイトSwaI部位に挿入し、F発現プラスミドpCALNdLw/Fを構築する。

### 4. SeV-F蛋白を誘導発現するヘルパー細胞の作製

F欠損ゲノムから感染ウイルス粒子を回収するため、SeV-F蛋白を発現するヘルパー細胞株を樹立する。細胞は、例えばSeVの増殖によく用いられているサル腎臓由来細胞株LLC-MK2細胞を用いることができる。LLC-MK2細胞は、10%の熱処理した非動化ウシ胎児血清(FBS)、ペニシリンGナトリウム 50単位/mlおよびストレプトマイシン 50μg/mlを添加したMEMで37°C、5%CO<sub>2</sub>で培養する。Cre DNAリコンビ

ナーゼによりF遺伝子産物を誘導発現されるように設計された上記プラスミドpCALNdLw/Fをリン酸カルシウム法 (Mammalian Transfection Kit ; Stratagene, La Jolla, CA) により、周知のプロトコールに従ってLLC-MK2細胞に遺伝子導入する。

具体的には、例えば、10cmプレートを用い、40%コンフルエントまで生育したLLC-MK2細胞に10 $\mu$ gのプラスミドpCALNdLw/Fを導入後、10mlの10% FBSを含むMEM培地にて、37°Cの5%CO<sub>2</sub>インキュベーター中で24時間培養する。24時間後に細胞をはがし、10ml培地に懸濁後、10cmシャーレ5枚を用い、例えば5ml 1枚、2ml 2枚、0.2ml 2枚に蒔き、G418 (Gibco-BRL, Rockville, MD) を1200 $\mu$ g/ml含む10mlの10% FBSを含むMEM培地にて培養を行い、2日毎に培地交換しながら、14日間培養し、遺伝子の安定導入株の選択を行う。該培地により生育してきたG418に耐性を示す細胞はクローニングリングを用いて例えば30株を回収する。各クローンは10cmプレートでコンフルエントになるまで拡大培養を続ける。

F遺伝子の安定導入株の選択は以下の方法で行う。すなわち、F蛋白質の発現量をウェスタンプロッティングで半定量的に解析することで行うことができる。各クローンのF蛋白質の発現誘導は、細胞を6cmシャーレにてコンフルエントまで生育させた後、アデノウイルスAxCANCreを斎藤らの方法 (Saito et al., Nucl. Acids Res. 23, 3816-3821, 1995; Arai, T. et al., J. Virol. 72(2), 1115-1121, 1998) により moi=3 で感染させて行う。感染3日後に、細胞の培養上清を取り除いた後、PBS緩衝液で2回洗浄し、スクレーパーで細胞を剥がし、1500×gで5分間遠心し細胞を回収する。該細胞は-80°Cで保存し、解凍後150 $\mu$ LのPBS緩衝液に懸濁し、更に同量の2×Tris-SDS-BME sample loading buffer (0.625M Tris (pH 6.8), 5% SDS, 25% 2-ME, 50% glycerol, 0.025% BPB, Owl社製) を加え、98°C3分間加熱処理後、電気泳動用試料に供する。該試料 (1レーンあたり 1×10<sup>5</sup>細胞) を周知のプロトコールに従ってSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動及びウェスタンプロッティングを行う。ウェスタンプロッティングにおける一次抗体

に抗SeV-F抗体（f236）を1/1000希釈で用い、各クローンのSeV-Fの発現を半定量的に解析する。

このような方法で、SeV-F遺伝子産物を誘導発現するLLC-MK2細胞の作出が確認される。以後、SeV-F遺伝子誘導発現前の該細胞をLLC-MK2/Fと表記し、誘導発現後の細胞をLLC-MK2/F/Adと表記する。

##### 5. F欠失SeVウイルスの再構成及び増幅

血管新生遺伝子を含むF欠失型センダイウイルスゲノムcDNAを、F発現ヘルパー細胞にトランスフェクションして発現させることにより、ウイルスを再構成することができる。例えば、上記 hFGF2遺伝子搭載F欠失型センダイウイルスゲノムcDNA (pSeV18<sup>+</sup>hFGF2/ΔF) を用いる場合は、このcDNAを以下のようにしてLLC-MK2細胞にトランスフェクションする。LLC-MK2 細胞を  $5 \times 10^6$  cells/dish で直径10cm のペトリ皿に蒔き、24時間培養後、ソラレンと長波長紫外線 (365nm) で20分間処理したT7 RNAポリメラーゼを発現するリコンビナントワクシニアウイルス (Fuerst, T.R. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83, 8122-8126, 1986) に室温で1時間感染させる (moi=2~3、好適にはmoi=2が用いられる)。ワクシニアウイルスへの紫外線照射には、例えば15ワットバルブ5本が装備された UV Stratalinker 2400 (カタログ番号 400676 (100V), Stratagene, La Jolla, CA, USA) を用いる。細胞を2回洗浄して、プラスミド pSeV18<sup>+</sup>hFGF2/ΔF、pGEM/NP、pGEM/P、pGEM/L (Kato, A. et al., Genes Cells 1, 569-579, 1996) および pGEM/F-HN (W000/70070) をそれぞれ12μg、4μg、2μg、4μg および4μg/dish の量比でOptiMEM (GIBCO) に懸濁し、SuperFect transfection reagent (1μg DNA/5 μl の SuperFect、QIAGEN) を入れて混合し、室温で15分間放置後、最終的に3%FBSを含むOptiMEM 3mlに入れ、細胞に添加して培養する。3~5時間培養後、細胞を血清を含まないMEMで2回洗浄し、シトシンβ-D-アラビノフラノシド 40μg/ml (AraC, Sigma) およびトリプシン 7.5μg/ml (GIBCO) を含み、血清を含まないMEMで24時間培養する。

培養上清を除き、上記でクローニングしたF発現ヘルパー細胞LLC-MK2/F/Ad細胞を重層する。具体的には血清を含まないMEM (40 μg/ml AraC、7.5 μg/ml トリプシンを含む) に分散したLLC-MK2/F/Ad細胞を、培養上清を除いた細胞に重層し、48時間培養を継続する。スクレイパーにてこれらの細胞を回収し、ペレットを0pt iMEM に懸濁し ( $10^7$  cells/ ml)、凍結融解を3回繰り返し行う。このライセートをLLC-MK2/F/Ad細胞 ( $4 \times 10^6$  cells /well 12-well-plate) にかけ (200 μl/well)、さらに300 μl/wellの血清を含まないMEM (40 μg/ml AraC、7.5 μg/ml トリプシンを含む) を添加し、15~24時間培養する。培養上清を除き、血清を含まないMEMで洗浄後、新たな血清を含まないMEM (40 μg/ml AraC、7.5 μg/ml トリプシンを含む) を添加し、5~9日間培養を行い上清を回収する。回収した上清には再構成されたF欠失型SeV粒子が含まれており、LLC-MK2/F/Ad細胞へ感染し、同じように血清を含まないMEM (40 μg/ml AraC、7.5 μg/ml トリプシンを含む) で培養を行うことで(或いはそれを繰り返すことで) F欠失型SeVを増幅することができる。

その際、F欠失型SeV粒子が含まれている培養上清を、0.22 μmのフィルターに繰り返し2回通することで、再構成時のT7 RNAポリメラーゼの発現に利用したリコンビナントワクシニアウイルスの混入をほとんど回避することができる。具体的には、2回以上AraCを含み血清を含まないMEM (40 μg/ml AraC、7.5 μg/ml トリプシンを含む) で増幅した培養上清 (P2以降のサンプル) について0.22 μmのフィルターに2回通し、更に1回AraCを含み血清を含まないMEM (40 μg/ml AraC、7.5 μg/ml トリプシンを含む) で増幅した培養上清を、リコンビナントワクシニアウイルスの混入を回避して増幅したF欠失型SeVとして取り扱うことができる。

欠損型ウイルスベクターを調製する場合、例えば、ゲノム上で欠損しているエンベロープ遺伝子が異なる2種のベクターと同じ細胞に導入すれば、それぞれで欠損するエンベロープタンパク質が、もう一方のベクターからの発現により供給されるため、互いに相補しあって感染力のあるウイルス粒子が形成され、複製サ

イクルがまわりウイルスペクターが増幅される。すなわち、2種またはそれ以上の本発明のベクターを、エンベロープタンパク質を相補する組み合わせで接種すれば、それぞれのエンベロープ遺伝子欠損型ウイルスペクターの混合物を大量かつ低成本で生産することができる。これらのウイルスは、エンベロープ遺伝子が欠損しているため、エンベロープ遺伝子を欠損していないウイルスに比べゲノムサイズが小さくなり長い外来遺伝子を保持することができる。また、元々感染性のないこれらのウイルスは細胞外で希釈され共感染の維持が困難であることから、不活性化するため、環境放出管理上の利点がある。

外来遺伝子として疾患の治療用遺伝子を用いてウイルスペクターを調製すれば、このベクターを投与して遺伝子治療を行うことが可能となる。本発明のウイルスペクターの遺伝子治療への応用としては、直接投与による遺伝子発現、間接(*e x vivo*)投与による遺伝子発現のいずれの方法によっても、治療効果を期待できる外来遺伝子もしくは患者の体内で供給が不足している内在遺伝子等を発現させることが可能である。外来遺伝子としては血管新生遺伝子または血管新生を促進する遺伝子であれば特に制限はなく、蛋白質をコードする核酸に加え、例えば、血管新生を抑制する遺伝子のアンチセンスまたはリボザイムなどのタンパク質をコードしない核酸であってもよい。

回収したパラミクソウイルスは実質的に純粋になるよう精製することができる。精製方法はフィルトレーション(濾過)、遠心分離、およびカラム精製等を含む公知の精製・分離方法またはその組み合わせにより行うことができる。「実質的に純粋」とは、ウイルスが、それが存在する試料中の成分として主要な割合を占めることを言う。典型的には、実質的に純粋なウイルスペクターは、試料中に含まれる全蛋白質のうち、ウイルスペクター由来の蛋白質の割合が50%以上、好ましくは70%以上、より好ましくは80%以上、さらに好ましくは90%以上を占めることにより確認することができる。パラミクソウイルスの具体的な精製方法としては、例えばセルロース硫酸エステルまたは架橋ポリサッカライド硫酸エステルを

用いる方法（特公昭62-30752号公報、特公昭62-33879号公報、および特公昭62-30753号公報）、およびフコース硫酸含有多糖および/またはその分解物に吸着させる方法（W097/32010）等を例示することができる。

本発明のパラミクソウイルスペクターは、薬学的に許容される所望の担体または媒体と共に組成物とすることができます。「薬学的に許容される担体」とは、ベクターと共に投与することができる。 「薬学的に許容される担体」とは、ベクターと共に投与することができる。「薬学的に許容される担体」とは、ベクターによる遺伝子導入を有意に阻害しない材料である。例えば本発明のパラミクソウイルスペクターを生理食塩水やリン酸緩衝生理食塩水（PBS）などで適宜希釈して組成物とすることができる。本発明のパラミクソウイルスペクターを鶏卵で増殖させた場合等においては尿液を含んでよい。また本発明のパラミクソウイルスペクターを含む組成物は、脱イオン水、5%デキストロース水溶液等の媒体を含んでいてもよい。さらに、その他にも、安定剤、殺生物剤等が含有されていてもよい。本発明は、本発明のベクターおよび薬学的に許容される担体を混合する工程を含む、本発明の血管新生組成物の製造方法を提供する。また本発明は、本発明の血管新生組成物の製造のための、本発明のベクターの使用に関する。本発明の組成物は医薬組成物としても有用である。本発明は、本発明のベクターおよび薬学的に許容される担体を含む、虚血治療製剤に関する。また本発明は、本発明のベクターまたは上記組成物の医薬としての使用にも関する。

上記のようにして得られたパラミクソウイルスペクターまたは該ベクターを含む組成物を投与することで、パラミクソウイルスペクターが持つ血管新生遺伝子を導入することができる。本発明は、本発明のパラミクソウイルスペクターまたは本発明の血管新生組成物を投与する工程を含む、血管新生を誘導する方法を提供する。この方法は、特に虚血組織を処置するための方法として有用である。投与部位に特に制限はないが、虚血の処置においては、導入遺伝子産物が虚血組織に集中し、全身の循環系に漏れ出さないように虚血組織またはその周辺に局所投与されるか、または適当な遺伝子送達系（ジーンデリバリーシステム）により目

的の組織周辺に局所発現させることができが好ましい。例えば、本発明のパラミクソウイルスベクター含有組成物を虚血組織内またはその外から *in vivo* で投与し、外来遺伝子を虚血組織で発現させることにより実施することができる。また、*ex vivo* による投与を行ってもよい。例えば、血管新生遺伝子をコードするパラミクソウイルスベクターを感染させた細胞を虚血組織局所、あるいは虚血組織を還流する動脈内に注入してもよい。

例えば、カテーテルを用いた局所投与も選択され得る。例えば、2つのバルーンにより血管を隔離し、バルーンで隔離された血管の間隙にベクター組成物を注入するダブルバルーンカテーテル法や、多孔性バルーンを用いた投与法等により本発明のベクターを投与してもよい (Jorgensen, B. et al., Lancet 1(8647):1 106-8, 1989; Wolinsky, H. and Thung, S. N., J. Am. Coll. Cardiol. 15(2): 475-81, 1990; WO93/00051; WO93/00052)。これらの投与においては、ヒドロゲルをコートしたバルーンを用いることもできる (Takeshita, S. et al., Lab. Invest. 75(4):487-501, 1996)。

例えば心筋梗塞や狭心症、その他の虚血性心疾患における治療においては、例えばカテーテルを用いて心室内腔より心筋内に直接本発明のベクター組成物を注入することができる。また、本発明のベクターをカテーテルにより局所注入することにより、冠状動脈内の狭窄部分の血管新生や側副血行路の発達を促進することができる。

しかし、カテーテルによるベクター投与は、インキュベーションに比較的長時間が必要であるほか、バルーンによる血管損傷なども懸念される。また、虚血組織内の瀰漫性の血管にカテーテルを挿入することは困難である場合も多い。本発明の虚血組織における処置においては、特に筋肉内 (intramuscular; IM) へのベクターの投与が好ましい。筋肉内への注入はカテーテルを介した投与よりも簡便であり、血管を損傷させる危険も低い。本発明のベクターは、例えば虚血組織またはその近傍の横紋筋に投与される。横紋筋は骨格筋および心筋を含む。ウイル

スペクターの投与前に、筋肉の再生を誘発することにより導入遺伝子の発現を増強することが知られているブピバカイン (bupivacaine) を投与してもよい。また、皮下 (intradermal; ID) 投与も選択し得る。筋内へのベクターの導入は、例えば、経皮的に導入する方法や開皮して直接導入する方法が挙げられる。ベクターの導入の際には、筋上膜を破損しないように処置することに留意する必要がある。投与は、例えば針とシリンジを用いて行いうる他、針を使わないバイオインジェクターにより投与することも可能である。投与は一箇所または複数箇所に投与し得る。また、投与は1回または複数回行うことができる。

本発明のベクターをマトリックスの形で投与することも有用である。知られている方法としては、アテロコラーゲンマトリックスにウイルスベクターを分散させて、凍結乾燥により固形化しマトリックスが徐々に崩壊することを応用するもので、一時的遺伝子発現で知られているアデノウイルスベクターや裸のDNAの効果持続化に関する報告がある (Ochida, T. et al., Nature Medicine 5, 707-710, 1999)。本発明のウイルスベクターは、このような助剤と共に存させることが可能であり、凍結乾燥可能である。また発現効果を増強するためにカチオン脂質を共存させることもできる。

投与可能な小さなマトリックスであっても、18G程度の注射針により長期間に亘り成長因子等を徐放できることは知られている。例えば、蛋白質の製剤において、成長ホルモン等の持続時間は、成長ホルモン等を単独で投与した場合に比べて、血液中の持続時間が長く、例えば、7日以上である。通常、10日以上に亘る持続も達成できると報告されている (特開平 10-001440)。そのため、製剤の投与回数、患者に与える苦痛を著しく低減できる。前記製剤は、例えば、皮下や筋肉内に投与される固形注射剤 (植込み剤など) や、座剤などの粘膜吸収剤として利用できる。剤形は、注射剤として用いる場合には、注射針で投与可能な柱状又は粒状である場合が多い。好ましい製剤の形状には、角柱状、円柱状などの柱状および球状などの粒状が含まれる。

本発明の非経口製剤の大きさも、投与形態に応じて選択でき、患者に過度の苦痛を与えることのない大きさであればよい。注射剤としては、柱状マトリックスで構成されている場合、例えば、直径3mm以下（例えば、0.1～3mm）、長さ30mm以下（例えば、0.5～30mm）、好ましくは14G以下の注射針で投与可能な直径1.3mm以下（例えば、0.1～1.2mm）、長さが20mm以下（例えば、0.5～20mm）、さらに好ましくは直径0.1～1mm、長さ1～20mm程度であり、円柱が好ましい。また、粒状マトリックスで構成された注射剤の粒径は、最大直径1mm以下（例えば、0.1μm～1mm程度）、好ましくは150μm以下（例えば、0.5～100μm程度）、さらに好ましくは1～100μm程度である。また、マトリックスの重量は、製剤の形態に応じて選択でき、注射剤においては、例えば、40mg以下、好ましくは1～25mg程度である場合が多い。

本発明のパラミクソウイルスベクターにより導入する遺伝子としては、血管新生および/または血管形成を促進するものであれば特に制限はないが、例えば上記のように、aFGF、FGF2 (bFGF)、VEGF、Ang (Ang-1およびAng-2を含む)、EGF、TGF- $\alpha$ 、TGF- $\beta$ 、PD-ECGF、PDGF、TNF- $\alpha$ 、HGF、IGF、EPO、CSF、M-CSF、GM-CSF、IL-8、NOSなどをコードする遺伝子が挙げられる。これらの蛋白質には、それぞれのファミリーに属する各メンバーやアイソフォームなどを含む。本発明のパラミクソウイルスにより導入する血管新生遺伝子の好適な一例として、特にFGF2をコードする遺伝子が挙げられる。FGF2は、例えば急性虚血の治療への応用が期待される。例えば、急性重症虚血肢の治療等において有意な治療効果が期待できる。また、FGF2は、心筋梗塞における治療効果も示されている (Yanagisawa-Miwa, A. et al., Science 257(5075):1401-3, 1992)。蛋白質は分泌蛋白質、膜蛋白質、細胞質蛋白質、核蛋白質などの形態であり得る。好ましくは分泌蛋白質である。また、人工的に構築した蛋白質であってもよい。人工的な蛋白質としては、例えば、他の蛋白質との融合蛋白質、ドミナントネガティブ蛋白質（受容体の可溶性分子または膜結合型ドミナントネガティブ受容体を含む）、欠失型の細胞接着分子

および細胞表面分子などの形態であり得る。また、分泌シグナルや膜局在化シグナル、核移行シグナル等を付加した蛋白質であってもよい。導入遺伝子は、虚血組織で内因的に発現が誘導される遺伝子であってもよく、また発現が誘導されない遺伝子を異所的に発現させてもよい。また、アンチセンスRNA分子またはRNA切断型リボザイムなどを発現させて虚血組織で発現する望ましくない遺伝子の機能を抑制することもできる。

本発明のベクターは、様々な虚血疾患および血管新生により治療可能な疾患に対する遺伝子治療に適用することが期待される。このような遺伝子治療には、例えば、血管切断や梗塞、血管解離等による血流遮断による虚血に対する治療が挙げられる。本発明のベクター投与の対象となる虚血疾患には、例えば脳血管虚血、腎虚血、肺虚血、四肢の虚血、虚血性心筋症、および心筋虚血が挙げられる。また、遺伝子治療の対象となる組織には特に制限はなく、例えば、筋肉、脳、腎臓、および肺が含まれる。また、移植における血管新生の促進にも有用である。また、様々な疾患モデルの作製や、疾患モデル等における治疗方法の開発または評価においても有用である。

ベクターの投与により血管新生が促進されたかは、例えば剖検試料中の毛細管数や毛細管密度の計測や、血管造影による画像解析等により確認することができる。また、ドップラー灌流像解析による血流量の解析により測定することもできる。虚血組織の処置の効果は、組織の壊死または脱落を巨視的または組織切片の顕微鏡観察などにより確認することができる。

本発明のパラミクソウイルスペクターは、薬学的有効量のベクターを対象組織に投与され、これによりこのベクターが対象組織の細胞に導入される。「薬学的有効量」とは、所望の治療または予防効果を少なくとも部分的にもたらすように対象組織の細胞に遺伝子が導入される量を言う。所望の血管新生遺伝子を含む本発明のパラミクソウイルスペクターの有効量が投与されることにより、ベクターが導入された細胞から血管新生因子が産生される。好ましくは、所望の血管新生遺

伝子を有する本発明のベクターの有効量が投与されることにより、投与された組織中で有意なレベルの血管新生因子が検出される。「有意なレベル」とは、本発明のベクターにより導入された遺伝子の発現量（転写産物または翻訳産物の量）が検出可能であることを指す。例えば、導入する遺伝子に対応する内因性遺伝子がある場合、導入した遺伝子の最大発現レベルが、内因的な発現レベルに対し有意に上昇していることを指す。好ましくは、投与部位における血管新生遺伝子の発現量が、内因的な発現量の約1.2倍以上、好ましくは約1.5倍以上、より好ましくは約2倍以上、より好ましくは約10倍以上、最も好ましくは約20倍以上の発現が得られることを言う。但し、導入遺伝子の発現量は、その有効発現量レベルおよび中毒レベルを考慮して決められるべきである。

細胞に導入された遺伝子の発現量は、当業者に公知の方法によりアッセイすることが可能である。遺伝子の転写産物は、例えば、ノーザンハイブリダイゼーション、RT-PCR、RNAプロテクションアッセイ等により検出・定量することができる。ノーザンハイブリダイゼーションやRT-PCR等による検出は *in situ* でも行い得る。また、翻訳産物を検出するには、抗体を用いたウェスタンプロット、免疫沈降、RIA、ELISA、プルダウンアッセイ等により行うことができる。また、導入遺伝子発現産物の検出を容易にするため、発現させる蛋白質にタグを付加したり、レポーター遺伝子を発現するように組み込んでおくことも可能である。レポーター遺伝子は、 $\beta$  ガラクトシダーゼ、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ (CAT)、アルカリホスファターゼ、または緑色蛍光蛋白質 (GFP) をコードする遺伝子等が挙げられるがこれらに制限はない。

ベクターの投与量は、疾患、患者の体重、年齢、性別、症状、投与目的、導入遺伝子等により異なるが、当業者であれば適宜決定することが可能である。好ましくは、投与するベクター量は約 $10^5$  cell-infectious units (CIU)/mlから約 $10^1$   $^1$  CIU/mlの範囲内であるとよい。より好ましくは、投与するベクターの量は約 $10^7$  CIU/mlから約 $10^9$  CIU/mlの範囲内であるとよい。最も好ましくは、約 $1 \times 10^8$  CIU/ml

から約 $5 \times 10^8$  CIU/mlの範囲内の量を薬学上容認可能な担体中で投与することが好ましい。本発明のウイルス含有組成物の投与対象としては、ヒト、サル、マウス、ラット、ウサギ、ヒツジ、ウシ、イヌなど全ての哺乳動物が含まれる。

ヒトにおける投与量は、通常、投与部位1箇所につき  $2 \times 10^8$  CIU～ $2 \times 10^{10}$  CIUの範囲であることが好ましく、より好ましくは  $2 \times 10^9$  CIUを中心とした投与量、例えば  $5 \times 10^8$  CIU～ $1 \times 10^{10}$  CIUなどである。投与回数は、1回または臨床上容認可能な副作用の範囲で複数回可能であり、1日の投与回数についても同様である。ヒト以外の動物についても、例えば投与する動物とヒトとの体重比または投与標的部位（虚血組織など）の重量比もしくは容積比に応じて投与箇所を増減または投与量を換算して投与することができる。

#### 図面の簡単な説明

図1は、中度（左）および重症（右）のマウス急性後肢虚血の手術手順の模式図である。分枝した線は後肢の動脈および静脈を示す。血管の切除部位を短い太い線で示した。

図2は、後肢虚血に伴う筋中（左）および血清（右）での内因性VEGF（黒）およびFGF2（白）の発現を示す図である。C57BL/6マウスの中度および重症虚血モデルを用いた。手術2日後に全大腿筋および腓骨筋（n=6）および血清（n=6）を採取し、ELISAに供した。値はそれぞれ筋の全抽出蛋白質または容量で標準化し、平均±S.D.で表した。筋の値は大腿筋および腓骨筋の両者のデータを含む（従って各群 n=12）。平均の値を図に示した。\*p<0.01、#p<0.05（一元配置分散分析による解析）。

図3は、虚血によるVEGFの発現の誘導をRT-PCRを用いて調べた結果を示す写真である。

図4は、SeVを介した筋中へのホタルルシフェラーゼ遺伝子の遺伝子導入における発現レベル（左）および時間経過（右）を示す図である。C57BL/6マウスの中度

虚血モデルにおいて、未処理、pCMV-luc ( $100\mu\text{g}$ ) 投与、または SeV-luc ( $10^7$  pfu または  $10^8$  pfu) 投与によるルシフェラーゼ活性を調べた（左）。右パネルは中度虚血モデルへのルシフェラーゼ遺伝子の導入における発現レベルの時間経過を示す。白丸：C57BL/6マウスへのpCMV-luc ( $100\mu\text{g}$ ) 投与、濃い丸：C57BL/6マウスへのSeV-luc ( $10^8$  pfu) 投与、薄い丸：BALB/c nu/nuマウスへのSeV-luc ( $10^8$  pfu) 投与。太い線は導入遺伝子発現が有意となるカットオフ（cut-off）値を表す。各グラフとも、遺伝子発現のレベルは同じスケールを用いている。logスケールであることに注意。

図5は、in vitro における血管新生蛋白質の分泌を、ヒト臍帯血管内皮細胞（HUVEC）、COS7細胞、ウシ血管平滑筋細胞（BSMC）、および心筋芽細胞（H9C2）を用いて測定した結果を示す図である。「ベーサルな放出（basal release）」は、ベクターなしにおける各因子の産生量を表す。導入遺伝子由来の発現が有意となるレベルをカットオフ（cut-off）値として示した。

図6は、C57BL/6マウスの中度の虚血肢に外来的に導入したFGF2 (a) およびVEGF (b) 遺伝子の筋中（左）および血清（右）でのin vivoの発現を示す図である。手術後直ぐにそれぞれのベクター溶液  $50\mu\text{l}$  を大腿筋および腓骨筋に注入した。手術2日後に全大腿筋および腓骨筋（n=6）および血清（n=6）を採取し、マウスFGF2 (a)、ならびにマウスおよびヒトVEGF (b) のELISAに供した。値はそれぞれ筋の全抽出蛋白質または容量で標準化し、平均士S.D.で表した。平均の値を図に示した。logスケールであることに注意。

図7は、遺伝子導入による内因性マウスVEGFの発現増強を示す図である。手術なし（左）、中度虚血（中央）、および重症虚血（右）のC57BL/6マウスの肢筋中ににおける内因性マウスVEGFの発現の遺伝子導入による増強を示す。手術の直後に、 $50\mu\text{l}$ の各ベクター溶液を大腿筋および腓骨筋に注入した。手術2日後に全大腿筋および腓骨筋および血清（各n=6、全部で n=12）を採取し、マウスVEGFのELISAに供した。値は筋の全抽出蛋白質で標準化し、平均士S.D.で表した。平均の値を

図に示した。\*p<0.01、#p<0.05（一元配置分散分析による解析）。

図8は、遺伝子導入によるマウス肢筋の組織像を示す写真である。C57BL/6マウスを重症虚血手術に供し、図7と同様に処理して、手術2日後に組織学的観察を行った。未処理動物（左上；非虚血（no ischemia））に比べ、明確な炎症性浸潤およびストローマ細胞の浮腫が偽投与（SeV-luciferase；mock）の大腿筋（右上）において認められた。重篤な筋線維の破壊、細胞内浮腫、および炎症性浸潤がVEGF165処理動物で観察された（左下；VEGF165）。これらの傷害は、FGF2遺伝子導入により抑制された（右下；FGF2）。各群とも6個体を用い、同様の結果を得た。ヘマトキシリン・エオシン染色。オリジナル倍率×200。

図9は、左後肢に手術して10日後における重症虚血マウスの筋中への血管新生因子遺伝子の外来導入の治療または増悪効果を示す写真である。各図に救肢スコア（limb salvage score；LSS）を示した。上段はC57BL/6マウスの重症虚血モデル〔救肢モデル（limb salvage model）〕における典型的な増悪効果を示す。VEGF165を導入したマウスは全肢が脱落（中央上パネル）したが、ルシフェラーゼの対照（左上パネル）およびFGF2処理マウス（右上パネル）は救肢された。下段はBALB/c nu/nuマウスの重症虚血モデル〔下肢脱落モデル（auto-amputation model）〕における典型的な治療効果を示す。FGF2処理したマウスは救肢され（右下パネル）たが、ルシフェラーゼの対照（左下パネル）およびVEGF165処理マウス（右下パネル）では後肢がほぼ全て脱落した。

図10は、救肢モデルおよび脱落肢モデルにおけるベクター投与後の後肢の予後曲線を示す図である。投与個体中で肢が残っている個体の割合（救肢率）を示した。血管新生遺伝子の筋中への遺伝子導入により、Aに示されたC57BL/6マウスの重症虚血モデル（救肢モデル）ではVEGF165の増悪効果が、Bに示されたBALB/c nu/nuマウスの重症虚血モデル（下肢脱落モデル）ではFGF2の治療効果が示されている。各群は3回の別々の実験を行った（n=10）。曲線はKaplan-Mayer法による。データはlog-rank検定により解析した。\*p<0.0001。

図11は、C57BL/6マウスの重症虚血（救肢モデル）を用いて、in vivoにおける血管新生効果をレーザードップラー灌流像解析により測定した結果を示す写真である。SeV-luciferase、SeV-VEGF165、およびSeV-FGF2を $10^7$  pfuで投与して、血液の灌流の回復を観察した。各群は同一個体の時間経過を示す。上段は、SeV-luciferase処理マウス（Mock transfection）の血流回復の時間経過の典型的な結果を示す。大腿筋の血液再灌流は手術4日後から認められ、7日目には明確に観察された。しかし、10日目でも下腿部の明確な灌流は検出されず、肢は萎縮し指の壊死の徴候が見られた（一番右のパネル）。中段はSeV-VEGF165処理マウスの典型的な時間経過を示す。大腿部および下腿部において、観察期間中、明確で有意な再灌流は認められず、肢は脱落した（一番右のパネル）。下段は、SeV-FGF2処理マウスの典型的な時間経過を示す。4日目までに大腿部で明確な再灌流を認め、10日目までには肢全体で有意な血流が見られ、完全に救肢された（一番右のパネル）。

図12は、C57BL/6マウスの重症虚血（救肢モデル）における血管新生遺伝子治療による血液灌流の回復を示す図である。図11と同様の実験における虚血肢および非虚血肢の平均血流量を算出し、右肢（非虚血）の血流値に対する左肢（虚血）の血流値の比として表した。 $*p<0.01$ （他の全ての群との比較において）、 $\#p<0.05$ （他の全ての群との比較において）、 $\#\#p<0.05$ 【偽投与群（mock）との比較において】。

図13は、マウス重症虚血モデル（脱落肢モデル）におけるhFGF2遺伝子搭載複製型SeVベクターまたはhFGF2遺伝子搭載F欠失型SeVベクター投与による救肢率の経時的観察結果を示す図である。実験個体数(n)およびベクターの投与量は図中に示した。

### 発明を実施するための最良の形態

実施例により本発明を具体的に説明するが、本発明はこれらの実施例に限定さ

れるものではない。なお、本明細書全体を通じて引用された文献はすべて、本明細書に組み込まれる。

組み換えSeVは以前の記載 (Yu, D. et al., *Genes Cells* 2(7):457-66, 1997; Yonemitsu, Y., et al., *Nature Biotech.* 18, 970-973 (2000); Kato, A., et al., *Genes Cells* 1, 569-579 (1996); Hasan, M. K., et al., *J. Gen. Virol.* 78, 2813-2820 (1997)) に従って調製した。

ウイルスの力価は、ニワトリ赤血球を用いたヘマグルチネーションアッセイにより決定した。高力価のストック ( $10^9$  pfu/ml) は使用時まで-80°Cで保存した。ヒトVEGF165 cDNA は以前に記載のようにRT-PCRで単離した (Yonemitsu, Y., et al., *Lab. Invest.* 75, 313-323 (1996))。マウスFGF2 cDNAは今村博士 (National Institute of Bioscience and Human-Technology, Tsukuba, Japan)より供与されたcDNAの部分配列に基づき、PCRにより全長マウスFGF2 cDNAを調製した (Imamura, T., et al., *Science* 249, 1567-1570 (1990))。具体的には、開始コドン領域および終止コドン領域を欠失したマウスFGF2 cDNAの部分断片 (Accession Number M30644 の 7~435番目の断片) を鋳型に用いて、マウスFGF2 cDNAの開始コドンを含むN末端側プライマー (5'-ACGTGCGGCCGCAAAGTTCATCCACCATGGCTGCCAGCG GCATCACCTCGCTTCCC-3' / 配列番号: 15) および終止コドン領域とSeV特異的配列とを含むC末端側プライマー (5'-ACGTGCGGCCGCGATGAACCTTCACCCCTAAGTTTCTTACT ACGCGGATCAGCTCTTAGCAGACATTGGAAGAACAGTATGGCCTTCTGTCCAGGTCCCGT-3' / 配列番号: 16) を用いて完全長cDNAを増幅した。このようにして調製したヒトVEGF165 cDNAおよびマウスFGF2 cDNAは、塩基配列が正しいことを確認した後、pSeV18<sup>b</sup>(+) (Hasan, M. K. et al., 1997, *J. General Virology* 78: 2813-2820) のN-otI部位に挿入した。ヒトVEGF165またはマウスFGF2を発現するセンダイウイルスベクターは、それぞれSeV-VEGF165またはSeV-FGF2と名付けた。SeV-luciferase (Hasan, M. K. et al., *J. Gen. Virol.* 78 (Pt 11): 2813-2820, 1997; Yonemitsu, Y. et al., *Nature Biotechnol.* 18: 970-973, 2000) およびpCMV-luciferase

rase (Yonemitsu, Y. et al., *Nature Biotechnol.* 18: 970-973, 2000) は上記と同様に調製した。

統計解析において、本実施例の全てのデータは平均±S.D.として表した。救肢以外のデータは Scheffeの修正を加えた一元配置分散分析により解析した。救肢データの解析は、救肢の割合を救肢スコア (limb salvage score; LSS) として表し、Kaplan-Mayer法により解析した。救肢実験の統計的有意差は log-rank検定を用いて決定し、全ての解析において、 $p<0.05$  を統計的に有意とした。

[実施例 1] 虚血により誘導される内因性VEGFの発現は後肢筋中の局所的な蛋白質蓄積を起きない

血管新生因子の治療効果または有害効果を明らかにするため、本発明者らは、2つの異なる手術を用いた虚血肢の3つのモデルを構築した(図1)。すなわち、(1)C57BL/6マウスの全大腿動脈および伏在動脈切除による中度の虚血肢(図1左に示した中度虚血モデル)(Couffinhal, T., et al., *Am. J. Pathol.* 152, 1667-1679 (1998); Kalka, C., et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97, 3422-3427 (2000))、(2)C57BL/6マウスの全外腸骨動脈、大腿動脈、およびそれらの周囲の分枝血管を全て切除するモデル(図1右に示した重症虚血モデル)、(3)免疫不全 BALB/c nu/nuマウスを用いて前記(2)と同じ手術を行うモデル(すなわち、BALB/c nu/nuマウスにおける重症虚血モデル)である。

成獣雄 C57BL/6、BALB/c、BALB/c nu/nu マウス(6-8週齢、Charles River Grade)はKBT Oriental Co. Ltd. (Tosu, Saga, Japan)より購入した。動物実験は認可された手順を採用し、九州大学における動物、組み換えDNA、および病原性感染実験委員会による研究動物の飼育および使用の推奨手順および日本国政府の法律(No.105)および告知(No.6)に従った。また、米国国立衛生研究所の「Principles of Laboratory Animal Care」および「Guide for the Care and Use of laboratory Animals」(publication No. NIH 80-23, revised 1985)にも従った。

ペントバルビタールの腹腔内注射により十分麻酔した状態で皮膚を切開し、中

度虚血モデルでは、表層の全大腿動静脈および伏在動静脈〔大腿深動脈 (deep femoral arteries) の直下から膝窩動静脈まで〕を結紮し切除した (図 1 左) (Coffinhal, T., et al., Am. J. Pathol. 152, 1667-1679 (1998); Kalka, C., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97, 3422-3427 (2000))。重症虚血モデルでは、さらに外腸骨動静脈から大腿深動脈までの切除を行った (図 1 右)。これらのモデルにおける肢の回復状態の再現性は、同一の術者 (I.M.) による 3 ~ 5 回の別々の実験により確認し、各手術では各モデルにつき 10 個体以上の動物を用いた。それぞれの救肢実験は、同一の実験者が同一条件の実験を 4 回繰り返して行った。

前記 (1) のモデルでは決して肢は失われず、場合により指の壊死の徵候を見せるのみであった。上記 (2) のモデル (すなわち C57BL/6 マウスにおける重症虚血モデル) では肢の壊死は起こらず (これを「救肢モデル(limb salvage model)」とも呼ぶ)、上記 (3) のモデル (BALB/c nu/nu マウスにおける重症虚血モデル) では全ての動物で手術 10 日以内にほぼ肢全体が脱落した (これを「下肢脱落モデル(limb amputation model)」とも呼ぶ)。免疫適合性 BALB/c マウスの重症虚血モデルでは、BALB/c nu/nu マウスと同程度の肢の壊死が観察された (データ省略)。BALB/c 系統のマウスは C57BL/6 系統に比べ増殖因子に対する血管新生の感受性が高いことが報告 (Rohan, M. R. et al., FASEB J. 14, 871-876 (2000)) されていることを考え合わせると、これらの結果は、C57BL/6 系統の救肢は血管新生に対する感受性よりもむしろ、側肢 (collateral limb) の循環がより高いことによる可能性が示唆される。

上記の中度および重症虚血モデルを用いて、虚血筋および血清の VEGF および FGF F2 の内因的発現を調べた。手術 2 日後、C57BL/6 マウスから各肢筋 (全大腿筋および腓骨筋) および血清を採取し、組織をホモジエナイズまたは溶解後、酵素結合イムノソルベントアッセイ (ELISA) に供した。組み換え蛋白質の合成は、ヒト VEGF またはマウス FGF2 用の Quantikine Immunoassay systems (R&D Systems Inc.

Minneapolis, MN) を用いて説明書に従って定量した。全蛋白質濃度を protein assay system (Bio-Rad Laboratories, Hertfordshire, UK) を用いて、Bradford法により決定し値を標準化した (Yonemitsu, Y., et al., Nature Biotech. 18, 970-973 (2000))。

全大腿筋と腓骨筋との間に蛋白質濃度の有意な差は見られなかったことから、両者を各群に含めて解析を行った。興味深いことに、虚血手術は 2 つの虚血肢モデル（中度モデル :  $847.5 \pm 187.7$  pg/g muscle、重症モデル :  $895.4 \pm 209.5$  pg/g muscle、各n=12）において、未処理マウスのベースライン ( $489.7 \pm 108.6$  pg/g muscle、n=12) に比べ、FGF2蛋白質の濃度を有意に上昇させた ( $p < 0.001$ ) (図 2)。一方、重症虚血群では虚血によるVEGF蛋白質の発現の上昇が見られたが、筋中において有意ではなかった (未処理 :  $174.7 \pm 43.1$ 、中度 :  $119.2 \pm 53.4$ 、および重症 :  $242.5 \pm 244.3$ 、n=12)。VEGFは組織の虚血でより強く発現が誘導される内皮増殖因子としてよく知られており (Shweiki, D. et al., Nature 359, 843-845 (1992); Forsythe, J. A., et al., Mol. Cell. Biol. 16, 4604-4613 (1996))、この結果はそれと一致しないように見える。そこで、VEGFが全身の循環系に放出される可能性を考え、血清中のVEGFレベルを測定した。すると予想通り、重症度に依存して血清中のVEGF蛋白質レベルの増加が観察されたが、血清中のFGF2は検出されなかった (図 2 右)。

本発明者らは、肢虚血は高分子または中分子量型のVEGFよりも、ヘパラン硫酸との相互作用能が低い低分子型のVEGFアイソフォーム (Cohen, T., et al., J. Biol. Chem. 270, 11322-11326 (1995)) を誘導すると予想した。これを確かめるため、VEGF188、164、144、および 120 を含むマウスVEGFのスプライシングフォーム (Burchardt, M., et al., Biol. Reproduct. 60, 398-404 (1999)) を識別できるプライマーセットを用いて、RT-PCRによりC57BL/6マウス雄（手術なし、中度虚血モデル、および重症虚血モデル）の手術 1 日後の大腿筋におけるVEGFアイソフォームの発現の解析を行った。プライマー対は以前記載 (Burchardt, M., e

t al., Biol. Reproduct. 60, 398-404 (1999)) されたラットVEGFのエクソン1およびエクソン8用のものを利用し、マウスVEGFアイソフォームの配列に対応するフォワードプライマー (5'-TGC ACC CAC GAC AGA AGG GGA-3' /配列番号：17) およびリバースプライマー (5'-TCA CCG CCT TGG CTT GTC ACA T-3' /配列番号：18) を用いた。最も小さいマウスVEGFアイソフォーム (VEGF115) の検出には、上記と同様のフォワードプライマー、およびVEGF115特異的リバースプライマー (5'-CTA CCA AAA GTT TCC CAG GCA G-3' /配列番号：19) を用いた (Sugihara, T. et al., J. Biol. Chem. 273, 3033-3038 (1998))。RT-PCRの条件は文献と同様にして行った (Burchardt, M., et al., Biol. Reproduct. 60, 398-404 (1999); Sugihara, T. et al., J. Biol. Chem. 273, 3033-3038 (1998))。

その結果、虚血に関連する内因性VEGFの発現は 164 アイソフォームのみ観察され、他のアイソフォームの明確な発現は検出されなかった (図3)。さらに、既知のもっとも小さいアイソフォームである VEGF115 (Sugihara, T. et al., J. Biol. Chem. 273, 3033-3038 (1998)) の発現をRT-PCRにより解析したが、検出することはできなかった。

[実施例2] マウス後肢への組み換えセンダイウイルスを介した筋中遺伝子導入のカイネティクス

カイネティクスの解析のため、まずホタルルシフェラーゼを用いて導入遺伝子の発現レベルと時間経過を調べた。ルシフェラーゼアッセイはルミノメーター (Model LB 9507, EG&G Berthold, Germany) を用いて文献に従って行った (Yonemitsu, Y., et al., Nature Biotech. 18, 970-973 (2000))。データは relative light units (RLU) /mg protein で表した。全蛋白質濃度を protein assay system (Bio-Rad Laboratories, Hertfordshire, UK) を用いて Bradford法により決定し、これによりルシフェラーゼアッセイの値を標準化した。重症虚血肢モデルでは明らかに肢筋が重度の破壊を受け、導入遺伝子の発現の低下が示唆されたため、中度虚血モデル (図1左) を用いて解析を行った。遺伝子の注入は、手術時

に大腿筋および下腿筋、それぞれ2箇所に $25\mu\text{l}$ ずつ行った。以下の投与量はその合計を示す。マウス (C57BL/6マウス) (6~8週齢、平均30g) に  $100\mu\text{g}$  の pCMV-luciferase (臨床用量のおよそ50倍の量) (Baumgartner, I., et al., Circulation 97, 1114-1123 (1998); Isner, J. M., et al., J. Vasc. Surg. 28, 964-973 (1998)) を投与したところ、遺伝子導入の2日後の測定では比較的高いルシフェラーゼ活性 (平均±S.D.=  $5.1\pm3.9\times10^6$  RLU/mg protein、n=6) を示したのに対し、 $10^7$  プラークフォーミングユニット (pfu) のSeV-luciferaseの投与ではその約5倍 ( $2.4\pm3.8\times10^7$  RLU/mg protein、n=12)、 $10^8$  pfuのSeVの投与では約120倍 ( $7.3\pm4.7\times10^8$  RLU/mg protein、n=6) の発現を示した (図4左)。

C57BL/6マウスの中度虚血モデルにルシフェラーゼ発現プラスミド (pCMV-luc) またはSeV-lucを上記と同様に投与し、導入遺伝子発現の時間経過を測定した。 $10^8$  pfuのSeV-luciferaseを筋中に投与した C57BL/6マウスの中度虚血モデルでも、時間経過と共に発現の低下が見られた (day 2 :  $7.3\pm4.3\times10^8$  RLU/mg protein、n=12、day 7 :  $3.4\pm4.7\times10^7$  RLU/mg protein、n=12、および day 14 :  $2.6\pm1.2\times10^4$  RLU/mg protein、n=12) (図4右)。 $10^8$  pfuのSeV-luciferaseを筋中に投与した BALB/c nu/nu免疫不全マウスの中度虚血モデルにおけるルシフェラーゼ活性は、day 7まではC57BL/6マウスと同様の時間経過を示したが、後期においてもその発現が維持された (day 2 :  $9.4\pm3.7\times10^8$  RLU/mg protein、n=12、day 7 :  $1.3\pm1.9\times10^7$  RLU/mg protein、n=12、および day 14 :  $0.9\pm1.3\times10^7$  RLU/mg protein、n=12)。

次に、in vitro における血管新生蛋白質の分泌を、筋肉系の初代ウシ血管平滑筋細胞 (BSMCs) および心筋芽細胞 (H9C2) に加え、初代ヒト臍帯血管内皮細胞 (HUVECs) および COS7細胞を含む様々な培養細胞を用いて測定した。本実施例で用いたFGF2ベクター (SeV-FGF2) は蛋白質分泌のための古典的なシグナル配列を持たないが、本発明者らおよび他者の研究により、分泌配列を持たないFGF2でも細胞外に発現されることが報告されている (Piotrowicz, R. S. et al., J. Biol.

Chem. 272, 7042-7047 (1997); Qu, Z., et al. et al., J. Histochem. Cytochem. 46, 1119-1128 (1998); Florkiewicz, R. Z. et al., J. Cell. Physiol. 162, 388-399 (1995))。予想通り、用量依存的に培養上清中にFGF2蛋白質の効率的な分泌が検出され、そのレベルはVEGF165と同等であった [例えば、MOI = 100では、VEGF165 vs FGF2 = 4,354±2,794 vs 3,682±1,063 (HUVECの場合), 275±58 vs 398±154 (BSMCの場合); 16,987±4,748 vs 5,976±381 (H9C2の場合); 38,648±4,913 vs 1,547,237±176,502 (COS7の場合)、それぞれ pg/10<sup>5</sup> 細胞/24時間、n=3] (図5)。

[実施例3] in vivo におけるSeVを介した血管新生因子の筋中発現のカイネティクス

C57BL/6 マウスの中度虚血モデル (図1左) へのSeV-VEGF165、および SeV-FG F2 の in vivo 筋中投与における血管新生因子の筋中発現を調べた。投与は大腿筋および腓骨筋のそれぞれ 2箇所、25μlずつ26ゲージ注射針にて、手術時に一回のみ投与した。

血管新生因子の in vivo 発現の結果は、in vitro の結果および in vivo レポーター遺伝子の結果と比べ興味深いものであった。図6に示したように、SeV-FG F2を介した蛋白質合成は用量依存的に増加し、高力価のベクター導入では内因性遺伝子の発現の約100倍に達した (大腿筋: 基底状態: 429±79、虚血: 974±150、10<sup>6</sup> pfu: 4,913±313、10<sup>7</sup> pfu: 13,469±12,611、および 10<sup>8</sup> pfu: 46,703±12,092 pg/g muscle、各n=6、腓骨筋: 基底状態: 550±104、虚血: 720±128、10<sup>6</sup> pfu: 1,376±158、10<sup>7</sup> pfu: 8,252±8,190、および 10<sup>8</sup> pfu: 59,704±35,297 pg/g muscle、各n=6)。SeV-FGF2投与群では、最も高い力価においても有意な血清FGF 2は検出されなかった。これに対し、VEGF165の用量依存的な増加は、FGF2のそれに比べはるかに少なく、10<sup>7</sup> pfuでも2倍に届かず、10<sup>8</sup> pfuでは逆にSeV由来のヒト VEGF165蛋白質の発現はほとんど検出されなかった (大腿筋: 基底状態: 176±44、虚血: 143±64、10<sup>6</sup> pfu: 159±67、10<sup>7</sup> pfu: 224±216、および 10<sup>8</sup> pfu: <5 p

g/g muscle、各n=6、腓骨筋：基底状態：173±45、虚血：95±28、 $10^6$  pfu：186±30、 $10^7$  pfu：172±101、および $10^8$  pfu： $<5$  pg/g muscle、各n=6)。内因性マウスVEGFの血清レベルは中度肢虚血では有意に増加したが(37.7±15.4 pg/ml, n=6)、ペクター由来のヒトVEGF165は有意には検出されず、筋中で発現させたVEG F165は全身の循環系には拡散しないことが示唆される。

[実施例4] 虚血により誘導される内因性VEGFの発現は血管新生遺伝子の導入により顕著に増強される

本発明者らは、VEGF165とFGF2の発現パターンの違いには、内因性VEGFの発現が関与しているのではないかと考えた。内因性VEGFの過剰な発現は、強すぎる透過性作用を介して組織の虚血を増悪させ、SeVからの転写を負に調節する可能性がある。また *in vitro* および *in vivo* において、FGF2の血管新生作用は、部分的には内因性VEGFの発現の増強よりもたらされていることが示されている(Asahara, T., et al., *Circulation* 92, 365-371 (1995))。

そこで、外来的に導入した血管新生因子遺伝子により媒介される筋中の内因性マウスVEGF蛋白質合成の変化を、マウスVEGF特異的ELISA系を用いて調べた。図7に示したように、VEGF165ではなく、FGF2の遺伝子導入は、正常循環(手術なし)および中度虚血の両方の肢条件において筋中の内因性マウスVEGFレベルを顕著に上昇させた。重症肢虚血では、2つの血管新生因子の遺伝子導入の両者において、内因性マウスVEGFの発現を劇的に上昇させ、特にVEGF165は虚血のみ(Mock)に比べ7倍程度まで上昇させた。

これをさらに詳細に調べるため、C57BL/6マウスの重症虚血モデルにおける血管新生因子の遺伝子導入による効果を組織学的に観察した(図8)。虚血手術後に偽導入を行った場合(mock)は、分散した密な筋線維(diffusely picnotic muscle fibers)は細胞内浮腫(intracellular edema)を伴い、2日後には炎症性の浸潤が見られた。これらの所見はVEGF165の遺伝子導入により顕著に増強された一方、FGF2の遺伝子導入では明らかに抑制された(図8)。

[実施例 5] 外来的に導入されたVEGF165は、急性重症虚血肢において救肢因子ではなく肢破壊因子として働く

上記の知見を基に、上記の中度および重症虚血肢モデルを用いて、*in vivo*における血管新生因子の遺伝子導入による治療効果を調べた。先に示したように、VEGF165では最も高い力値である  $10^8$  pfuの投与において導入遺伝子産物の産生が見られなかったことから、 $10^7$  pfuのウイルス投与により *in vivo* 治療効果を観察した。ここで、肢の壞死の程度を 4段階の救肢スコアに分類した (Limb Salvage Score; LSS)。LSS=4: 完全な救肢 (complete limb salvage)、LSS=3: 足蹠から先の壞死 (limb necrosis below heel)、LSS=2: 膝から先の壞死 (limb necrosis below knee)、LSS=1: 膝より上までの壞死 (limb necrosis above knee)、および LSS=0: 鼠径靭帯周辺からの全下肢脱落 (total auto amputation around the inguinal ligament)。この分類に基づき、まずSeVを介した血管新生因子の発現の毒性を C57BL/6マウスの重症虚血肢の救肢モデルを用いて調べた。血管新生遺伝子の導入は実施例 2と同様に行った。

虚血術の2日前にベクターの注入を行った場合、全ての群で全ての肢が完全に維持された (データ省略)。手術時にベクターの注入を行った場合、VEGF165投与群以外は、FGF2投与群を含め、全ての群のマウスで完全に救肢された (%LLS=100%)。しかしながら、図9 および 10 に示したように、VEGF165投与マウスでは肢が脱落する個体が観察された (5/10は肢脱落した。%LLS=52.2%，他の群と比べた場合  $p<0.0001$ ) (図10A)。この結果から、VEGF165の遺伝子導入による肢破壊効果が示唆される。次に、BALB/c nu/nuマウスの重症虚血モデル (脱落肢モデル) を用いて、血管新生因子の遺伝子治療の効果を検証した。その結果、SeV-FGF2投与は nu/nuマウスの肢脱落を有意に抑制した (2/10が肢脱落、%LLS=77.5%) のに対し、SeV-VEGF165の投与 (8/10が肢脱落、%LLS=15.0%) は、ルシフェラーゼ発現SeVの投与 (5/6が肢脱落、%LLS=16.7%) と同様、後肢の予後を改善させなかつた (図10B)。この結果は、FGF2の遺伝子導入が救肢効果を持つことを明確に示して

いる。

次に、重症虚血手術を行った左足の血流の回復に対する筋肉内遺伝子導入処置による効果をレーザードップラー灌流像解析により測定した (Couffinhal, T., et al., Am. J. Pathol. 152, 1667-1679 (1998); Murohara, T., et al, J. Clin. Invest. 105, 1527-1536 (2000))。遺伝子導入の条件は、前述の図10A(救肢モデル)と全く同じ条件とし、C57BL/6マウスの重症虚血モデル(救肢モデル)を用いた。虚血脉(左)／正常肢(右)の血流比の測定を、レーザードップラー灌流像(laser Doppler perfusion image; LDPI)解析機(Moor Instruments, Devon, UK)を用いて文献に従って行った (Couffinhal, T., et al., Am. J. Pathol. 152, 1667-1679 (1998); Murohara, T., et al, J. Clin. Invest. 105, 1527-1536 (2000))。具体的には、体温によるデータの変動を最小限に抑えるため、レーザースキャニングを行う前に、マウスを37°Cの恒温板に置いた。予め決めた時間(実験前および手術後2、4、7、および10日)に、それぞれの個体の目的の部位(肢および足)を2回連続してスキャニングを行った(図11)。2回のスキャニングで本質的な違いは見られなかった。レーザースキャニング後、保存した画像をコンピュータによる血流量の測定にかけ、虚血および非虚血足の平均血流量を算出した。周囲の光や温度の影響によるデータの変動を抑えるため、LDPIインデックスは右肢(非虚血)の血流値に対する左肢(虚血)の血流値の比として表した。

SeV-luciferase(Mock)およびSeV-FGF2の投与は、いずれも4日目において大腿上部周辺に明らかな血流が検出され、特にFGF2投与群では4、7、および10日目において腓骨筋への有意な血流が見られ、同時期のluciferase投与群では大腿筋に限られた血流が見られたとの差が見られた(図11)。代表的な結果では、luciferase投与群の肢は軽度の萎縮(mildly atrophic limb)を起すものがあった一方、FGF2投与群のほとんどの肢は障害を示さなかった。これらとは対照的に、VEGF165投与マウスは大腿筋にほとんど血流が見られず、下肢脱落を起した(図

11)。SeV-VEGF165を投与された全てのマウスは、少なくとも膝レベルにおいて肢を失った。以下に、それぞれの投与群における肢血流の観察結果を詳述する。

#### 1. SeV-luciferaseを投与した個体

手術直後は左下肢の血流はほとんど見られなかった。次第に血流が回復し、4日目頃には大腿部の中央付近まで血流の回復が見られた。しかし10日目までこの個体の下腿までの血流は回復しなかった。結果として、パネル右端に示したように下肢は腐らなかつたが、やや萎縮していた。同様の個体は1/3程度で観察された。これよりも回復が進んだ例も認められた。

#### 2. SeV-VEGF165を投与した個体

上記と同様に、手術直後はほとんど血流が消失した。以後、経時的に観察しても大腿部の血行の回復はほとんど認めず、結果としてパネル右端に示したように大腿の中程より下肢が脱落した。10個体の全例で全く同様の結果を得た。

#### 3. SeV-FGF2投与個体

上記と同様に、手術直後の左下肢の血流はほとんど消失した。血流の消失範囲はSeV-luciferaseを投与した個体と同程度であった。4日目頃から強い血流（赤いスポットで示される）が大腿部に現われ、7日目には既に弱いながら下腿の血行が認められた。10日目には、僅か（青で示される）ながら左下肢全体に有意な血行が認められ、結果として、パネル右端に示したように下肢は外見上全く正常のまま維持された。

各群において、ドップラー像に基づく大腿筋の血流を統計学的に比較した。図12に示したように、SeV-FGF2投与マウスは、SeV-luciferase投与マウスに比べ、肢血流の生理的回復時の血流は有意に高い値を示した。これに対し、SeV-VEGF165投与マウスの大腿筋の血流は低い値に留まり、手術後7日目以降は多くの動物で下肢中央部またはそれより上部から肢が脱落した。

[実施例6] 複製能欠損型センダイウイルスペクターを用いた急性虚血肢治療  
1. 血管新生遺伝子搭載F欠失型センダイウイルスゲノムcDNAの構築

センダイウイルス (SeV) の全長ゲノムcDNAを含む pSeV18<sup>+</sup> b(+) (Hasan, M. K. et al., J. Gen. Virol. 78, 2813-2820, 1997) からF遺伝子を欠失させたプラスミドpSeV18<sup>+</sup>/ΔF (W000/70055およびW000/70070参照) のF遺伝子の欠損部位にEGFP遺伝子を搭載したプラスミド (pSeV18<sup>+</sup>/ΔF-GFP) を構築するため、まずEGFP遺伝子のPCRによる増幅を行なった。EGFP遺伝子断片の塩基数を6の倍数 (Hausmann, S. et al., RNA 2, 1033-1045, 1996) に合わせるため、5'末端はNsi-tailedプライマー (5'-atgcatatggtgatgcggtttggcagtac／配列番号：9)、3'末端はNgoMIV-tailedプライマー (5'-tgccggctattattacttgtacagctcgtc／配列番号：10) を用いてPCRを行った。PCR産物を制限酵素MsIIとNgoMIVで消化してゲルから断片を回収し、pUC18/dFSSのF欠損部位にあるNsIIとNgoMIVという制限酵素部位に連結し、シークエンスを確認した。ここからEGFP遺伝子を含むDraIII断片を回収し、pSeV18<sup>+</sup>のF遺伝子を含む領域のDraIII断片と置き換え、ライゲーションしてpSeV18<sup>+</sup>/ΔF-GFPを得た。ただし、pSeV18<sup>+</sup>/ΔFの場合は、F遺伝子のEIS配列 (SeV特異的配列、E; end, I; intergenic, S; start) が残存し、下流のF遺伝子のORFは除かれているものの、この部位の連結に用いたプライマー由来の5アミノ酸ペプチドが発現する可能性のある構造になっている。またpSeV18<sup>+</sup>/ΔF-GFPの場合はGFPが共発現するので、そのペプチド及びGFPが共発現する可能性のないベクターの構築を行った。そのためには下記の様に組み換えを行なった。

pSeV18<sup>+</sup>/ΔF-GFPをSalIとNheIで消化してF欠損部位を含む領域の断片 (6288bp) を回収し、Litmus38 (New England Biolabs, Beverly, MA) にクローニングし、LitmusSalINheIfrg/ΔF-GFPとした。欠損させたF遺伝子上流のEIS配列を含むEGFP遺伝子の欠損はInverse PCR法により行なった。すなわち、GFP遺伝子上流で制限酵素SexAIの認識配列をデザインしたreverseプライマー (5'-gtttaccagggtggagagtttgcaaccaaggcac／配列番号：11) とGFP遺伝子下流で制限酵素SexAIの認識配列をデザインしたforwardプライマー (5'-ctttcacctggtaacaaggcacagatcatggatgg／配列番号：12) でPCRを行ない、目的の大きさの断片 (10855 bp) を切り出

してそのままライゲーションを行ない、欠損させたF遺伝子上流のEIS配列を含むEGFP遺伝子を欠失させた。

この場合、プライマーデザイン上のSexA1に挟まれた配列15bpが余分に挿入されている。そこで、プラスミドを大腸菌SCS110株にトランスフォームして調製し(SexA1はメチル化の影響を受け切断出来なくなるのでdcm<sup>-</sup>/dam<sup>-</sup>のSCS110株を利用した)、制限酵素SexA1で消化後、1628bp及び9219bpの2つの遺伝子断片を回収してライゲーションを行ない、余分な15 bpを欠失させ、6の倍数でF遺伝子上流のEIS配列を含むEGFP遺伝子を欠失させたLitmusSalI/NheIfrg/ΔF (△5aa) を調製した。このプラスミドをSalI及びNheIで消化して断片を回収し、pSeV18<sup>+</sup>のF遺伝子を含む領域のSalI/NheI断片と置き換え、ライゲーションしてプラスミドpSeV18<sup>+</sup>/ΔF (△5aa)を得た。このプラスミドへの血管新生遺伝子(例としてヒトFGF2を用いた)挿入は、NP遺伝子の前に位置する制限酵素NotIの認識配列を利用して以下のように行った。

## 2. hFGF2遺伝子搭載F欠失型センダイウイルスゲノムcDNAの構築

ヒトの FGF2 (hFGF2) cDNAは、患者本人の了承を得て採取したヒト大伏在静脈から分離した血管平滑筋細胞よりRT-PCRにて分離し、pBluescriptSK+ (Stratagene, La Jolla, CA) のHindIII (5'末端)、EcoRI (3'末端) にサブクローニングして調製した。その際、hFGF2 cDNAの遺伝子配列はAbrahamらの報告 (Abraham, J. A. et al., EMBO J. 5 (10), 2523-2528 , 1986) と同一であることを確認した。

pSeV18<sup>+</sup>/ΔF (△5aa) のNP遺伝子の前に位置する制限酵素NotIの位置にhFGF2遺伝子を挿入するために、まずhFGF2遺伝子の3'端側にSeV特異的配列(EIS配列)を付加して両端にNotI認識配列を有するフラグメントを調製した。具体的には、上記 hFGF2 cDNAを鋳型にして、開始コドンを含むN末端側プライマー (5'-atccgcggccgccaaggttcacttatggcagccggagcatcaccacgctgccgccttgccccgaggatggcgccagcgcc/配列番号: 13) および終止コドン領域とEIS配列とを含むC末端側プライマー (5'-atccgcggccgcgtgaactttcacccctaagttttcttactacggtcagctcttagcaga

catttggaaagaaaaagtatagc／配列番号：14）を用いてPCRを行ない、NotI消化後、pBluescriptSK+ (Stratagene, La Jolla, CA) のNotI部位にサブクローニングしてpBS-hFGF2を調製し、塩基配列を確認した。pBS-hFGF2をNotIで消化後、hFGF2 cDNAを含む断片をpSeV18<sup>+</sup>/ΔF (△5aa) のNP遺伝子の前に位置するNotI部位に挿入し、hFGF2遺伝子搭載F欠失型センダイウイルスゲノムcDNA pSeV18<sup>+</sup>hFGF2/ΔF (△5aa) を構築した (pSeV18<sup>+</sup>hFGF2/ΔF (△5aa) は、pSeV18<sup>+</sup>hFGF2/ΔFとも表記する)。また、複製能を有するウイルス cDNAをコードするpSeV18<sup>+</sup> b(+)のNotI部位にもhFGF2 cDNAを含むNotI断片を挿入し、pSeV18<sup>+</sup>hFGF2を構築した。pSeV18<sup>+</sup>hFGF2からは、公知の方法 (Hasan, M. K. et al., J. Gen. Virol. 78: 2813-2820, 1997; Kato, A. et al., 1997, EMBO J. 16: 578-587; Yu, D. et al., 1997, Genes Cells 2: 457-466) によりヒトFGF2を発現する複製型SeVベクターを調製し、SeV-hFGF2とした。

### 3. F欠失SeVウイルスの再構成及び增幅

センダイウイルスのF遺伝子 (SeV-F) をCre DNAリコンビナーゼにより誘導的に発現するF発現ヘルパー細胞 (LLC-MK2/F; W000/70055およびW000/70070参照) を用いて、F欠損SeVベクターの再構築を行った (SeV-F遺伝子誘導発現前の該細胞をLLC-MK2/Fと表記し、誘導発現後の細胞をLLC-MK2/F/Adと表記する)。LLC-MK2 細胞を  $5 \times 10^6$  cells/dish で直径10cm のペトリ皿に蒔き、24時間培養後、ソラレンと長波長紫外線 (365nm) で20分間処理したT7 RNAポリメラーゼを発現するリコンビナントワクシニアウイルス (Fuerst, T.R. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83, 8122-8126, 1986) に室温で1時間感染させた (moi=2)。ワクシニアウイルスへの紫外線照射には、15ワットバルブ5本が装備された UV Stratalinker 2400 (カタログ番号 400676 (100V), Stratagene, La Jolla, CA, USA) を用いた。細胞を2回洗浄して、プラスミド pSeV18<sup>+</sup>hFGF2/ΔF、pGEM/NP、pGEM/P、pGEM/L (Kato, A. et al., Genes Cells 1, 569-579, 1996) および pGEM/F-HN (W00/70070) をそれぞれ12μg、4μg、2μg、4μg および4μg/dish の量比でOptiM

EM (GIBCO) に懸濁し、SuperFect transfection reagent ( $1\mu\text{g}$  DNA/ $5\mu\text{l}$  の SuperFect、QIAGEN) を入れて混合し、室温で15分間放置後、最終的に3%FBSを含むOptiMEM 3mlに入れ、細胞に添加して培養した。3~5時間培養後、細胞を血清を含まないMEMで2回洗浄し、シトシン $\beta$ -D-アラビノフラノシド  $40\mu\text{g}/\text{ml}$  (Ara C、Sigma) およびトリプシン  $7.5\mu\text{g}/\text{ml}$  (GIBCO) を含み、血清を含まないMEMで24時間培養した。

培養上清を除き、上記でクローニングしたF発現ヘルパー細胞LLC-MK2/F/Ad細胞を重層した。具体的には血清を含まないMEM ( $40\mu\text{g}/\text{ml}$  AraC、 $7.5\mu\text{g}/\text{ml}$  トリプシンを含む) に分散したLLC-MK2/F/Ad細胞を、培養上清を除いた細胞に重層し、48時間培養を継続した。スクレイパーにてこれらの細胞を回収し、ペレットをOptiMEMに懸濁し ( $10^7$  cells/ $\text{ml}$ )、凍結融解を3回繰り返し行った。このライセートをLLC-MK2/F/Ad細胞 ( $4 \times 10^6$  cells /well 12-well-plate) にかけ ( $200\mu\text{l}/\text{well}$ )、さらに $300\mu\text{l}/\text{well}$ の血清を含まないMEM ( $40\mu\text{g}/\text{ml}$  AraC、 $7.5\mu\text{g}/\text{ml}$  トリプシンを含む) を添加し、15~24時間培養した。培養上清を除き、血清を含まないMEMで洗浄後、新たな血清を含まないMEM ( $40\mu\text{g}/\text{ml}$  AraC、 $7.5\mu\text{g}/\text{ml}$  トリプシンを含む) を添加し、5~9日間培養を行い上清を回収した。回収した上清をLLC-MK2/F/Ad細胞へ感染し、同じように血清を含まないMEM ( $40\mu\text{g}/\text{ml}$  AraC、 $7.5\mu\text{g}/\text{ml}$  トリプシンを含む) で培養を行うことでF欠失型SeVを増幅した。

その際、F欠失型SeV粒子が含まれている培養上清を、 $0.22\mu\text{m}$ のフィルターに繰り返し2回通することで、再構成時のT7 RNAポリメラーゼの発現に利用したリコンビナントワクシニアウイルスの混入を除去した。具体的には、2回以上AraCを含み血清を含まないMEM ( $40\mu\text{g}/\text{ml}$  AraC、 $7.5\mu\text{g}/\text{ml}$  トリプシンを含む) で増幅した培養上清 (P2以降のサンプル) について $0.22\mu\text{m}$ のフィルターに2回通し、更に1回AraCを含み血清を含まないMEM ( $40\mu\text{g}/\text{ml}$  AraC、 $7.5\mu\text{g}/\text{ml}$  トリプシンを含む) で増幅した培養上清を回収し、リコンビナントワクシニアウイルスの混入を回避して増幅したF欠失型SeV (SeV-hFGF2/ $\Delta F$ ) を得た。

#### 4. 複製型および複製能欠失型ヒトFGF2発現SeVベクターを用いた虚血肢遺伝子治療

実施例1に記載の BALB/c nu/nuマウス重症虚血モデル（脱落肢モデル）を用いて、複製型および複製能欠失型ヒトFGF2発現SeVベクターの投与による治療効果を検証した。血管新生遺伝子の導入は実施例2と同様に行った。ベクターの注入は手術時に行った。手術後の肢脱落を観察し、各時点における救肢率（肢が残っている個体の割合）を算出した（図13）。

対照のルシフェラーゼ発現SeV (SeV-luciferase) を投与したマウスでは、非投与マウスと同様に高い頻度で肢が脱落した。これに対し、ヒトFGF2発現ベクター (SeV-hFGF2およびSeV-hFGF2/△F) を投与した場合は肢脱落を有意に抑制した。本実施例により、ヒトFGF2を発現するパラミクソウイルスベクターが虚血治療のため血管新生遺伝子として高い効果を有することが示された。さらに、複製能欠失型パラミクソウイルスベクターが虚血治療に有効であることを実証した。

#### 産業上の利用の可能性

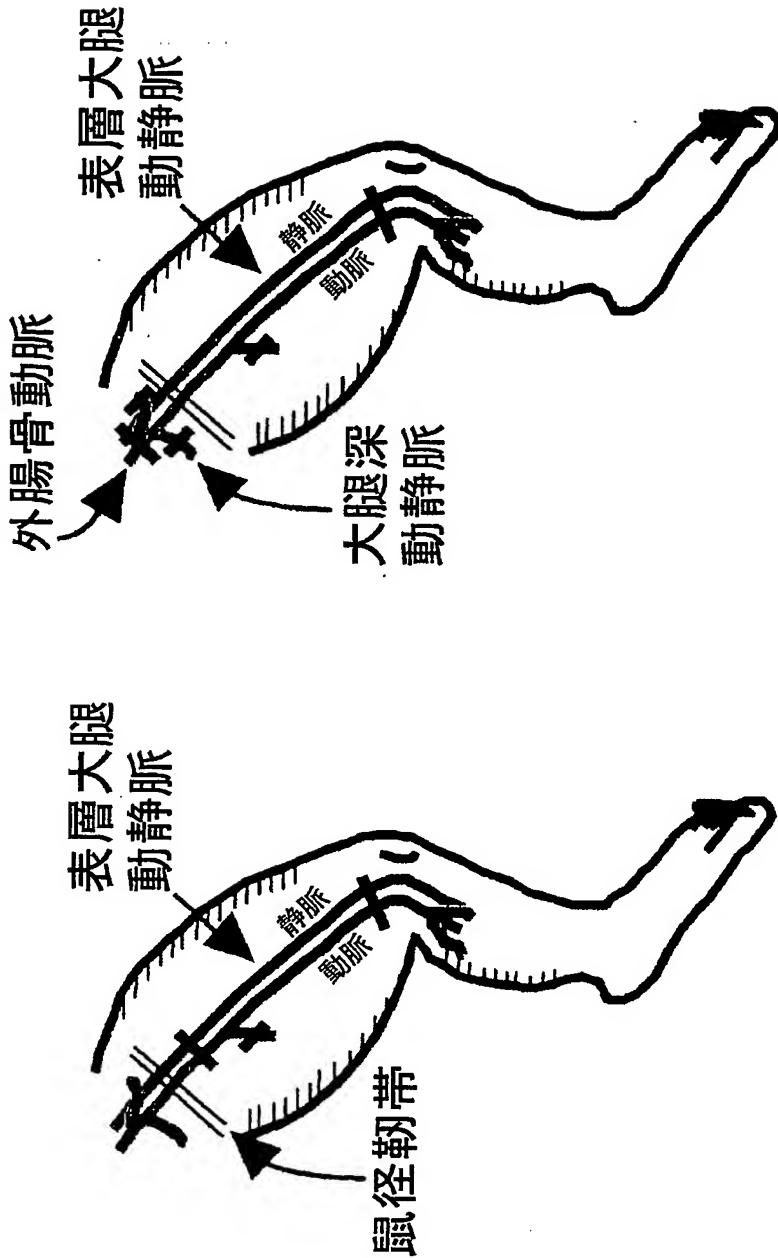
本発明により、虚血組織を標的とした遺伝子治療のための基盤技術が提供された。これにより、虚血組織の血管新生を効果的に誘導し、壊死を防止することが可能となる。

### 請求の範囲

1. 血管新生遺伝子を発現可能にコードするパラミクソウイルスペクター。
2. 血管新生遺伝子が線維芽細胞増殖因子2 (FGF2) である、請求項 1 に記載のパラミクソウイルスペクター。
3. パラミクソウイルスがセンダイウイルスである、請求項 1 に記載のパラミクソウイルスペクター。
4. F遺伝子を欠損している、請求項 1 に記載のパラミクソウイルスペクター。
5. 請求項 1 に記載のパラミクソウイルスペクターまたは該ベクターを含む細胞、並びに薬学的に許容できる担体を含む、血管新生組成物。
6. 虚血組織を処置するための、請求項 5 に記載の組成物。
7. 筋中投与用である、請求項 5 に記載の組成物。
8. 請求項 5 から 7 のいずれかに記載の血管新生組成物を投与する工程を含む、血管新生を誘導する方法。

図 1

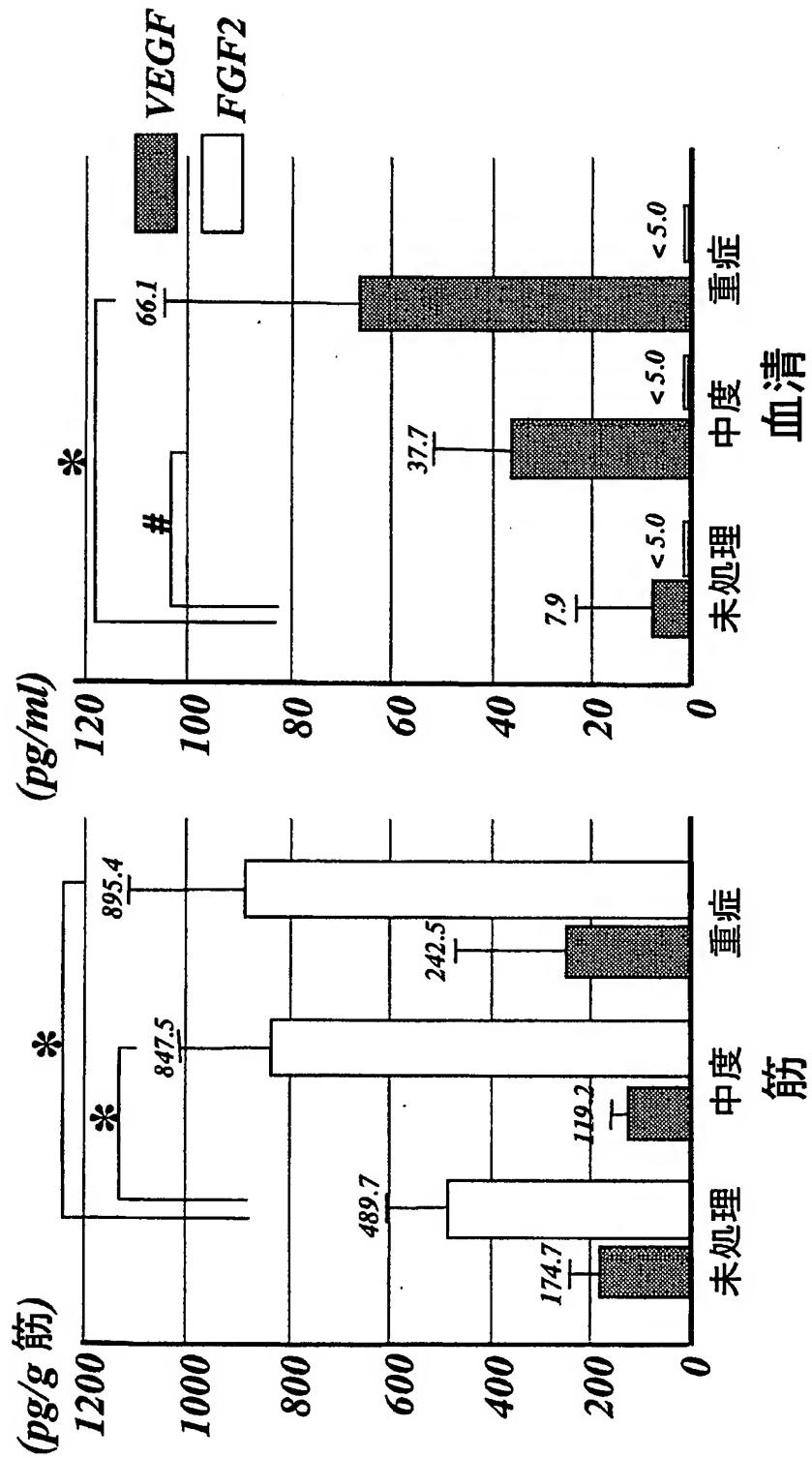
重症虚血後肢  
中度虚血後肢



C57BL/6: 下肢脱落(-)  
Balb/c nu/nu: 下肢脱落(+)

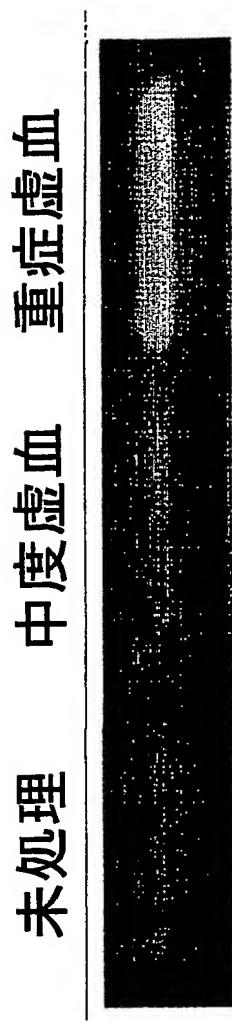
2 / 13

図 2



3 / 13

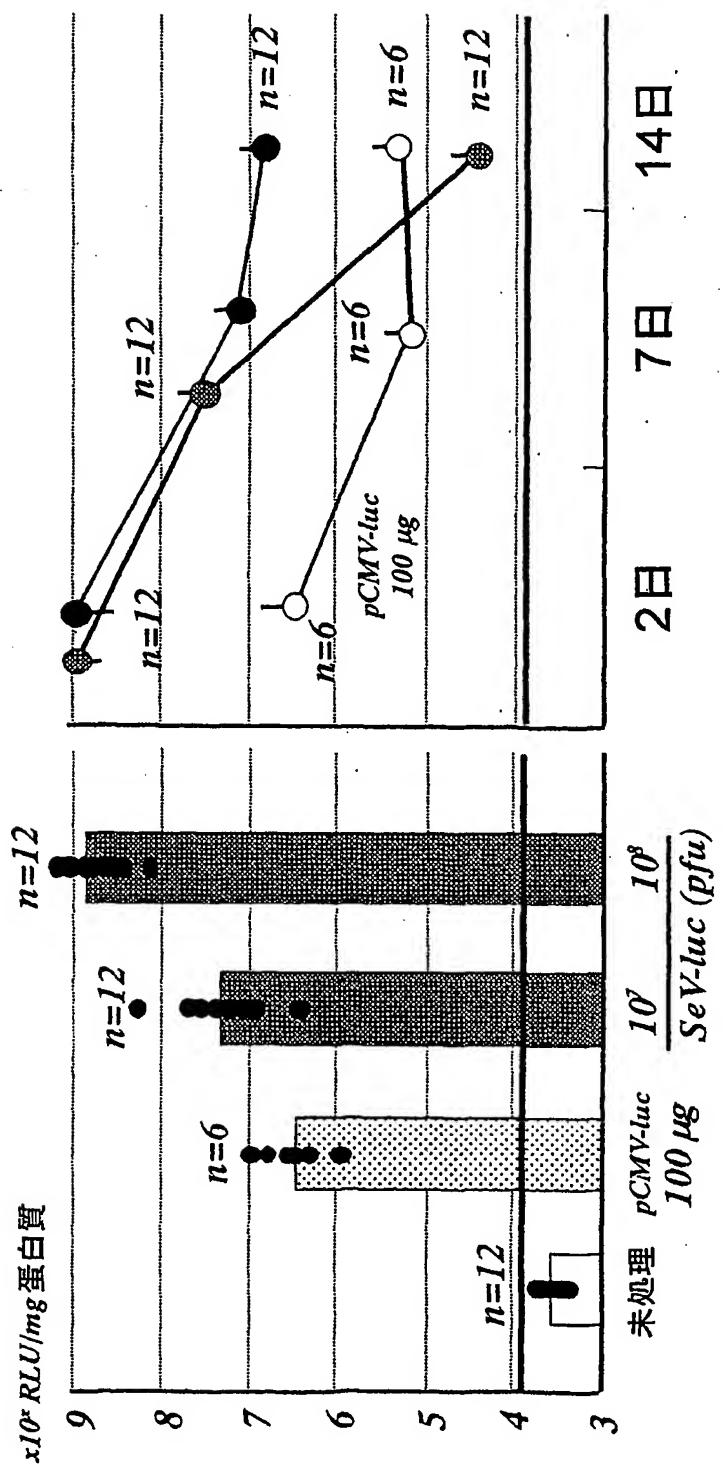
図 3



*mVEGFI64* →

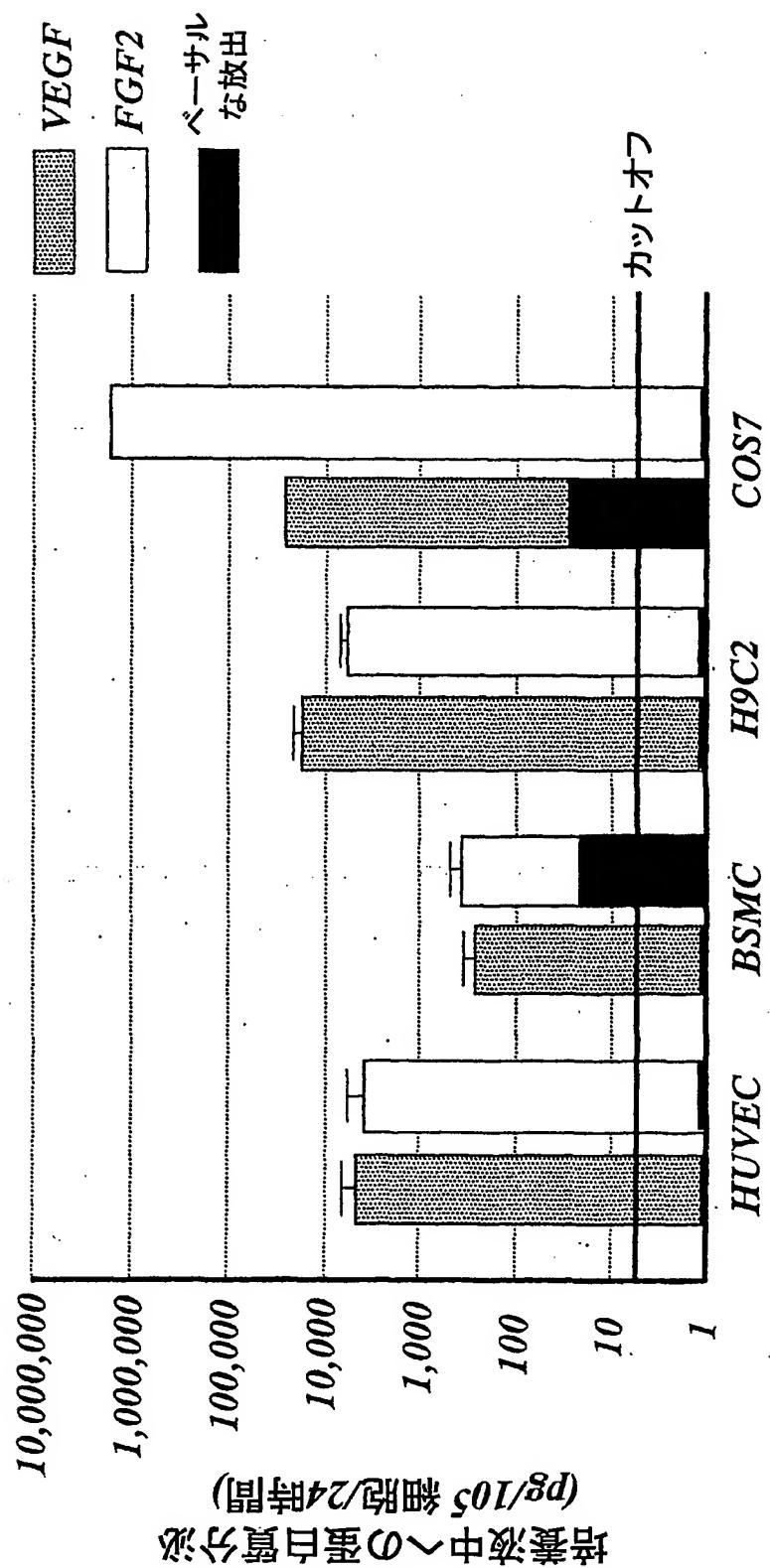
4 / 13

図4



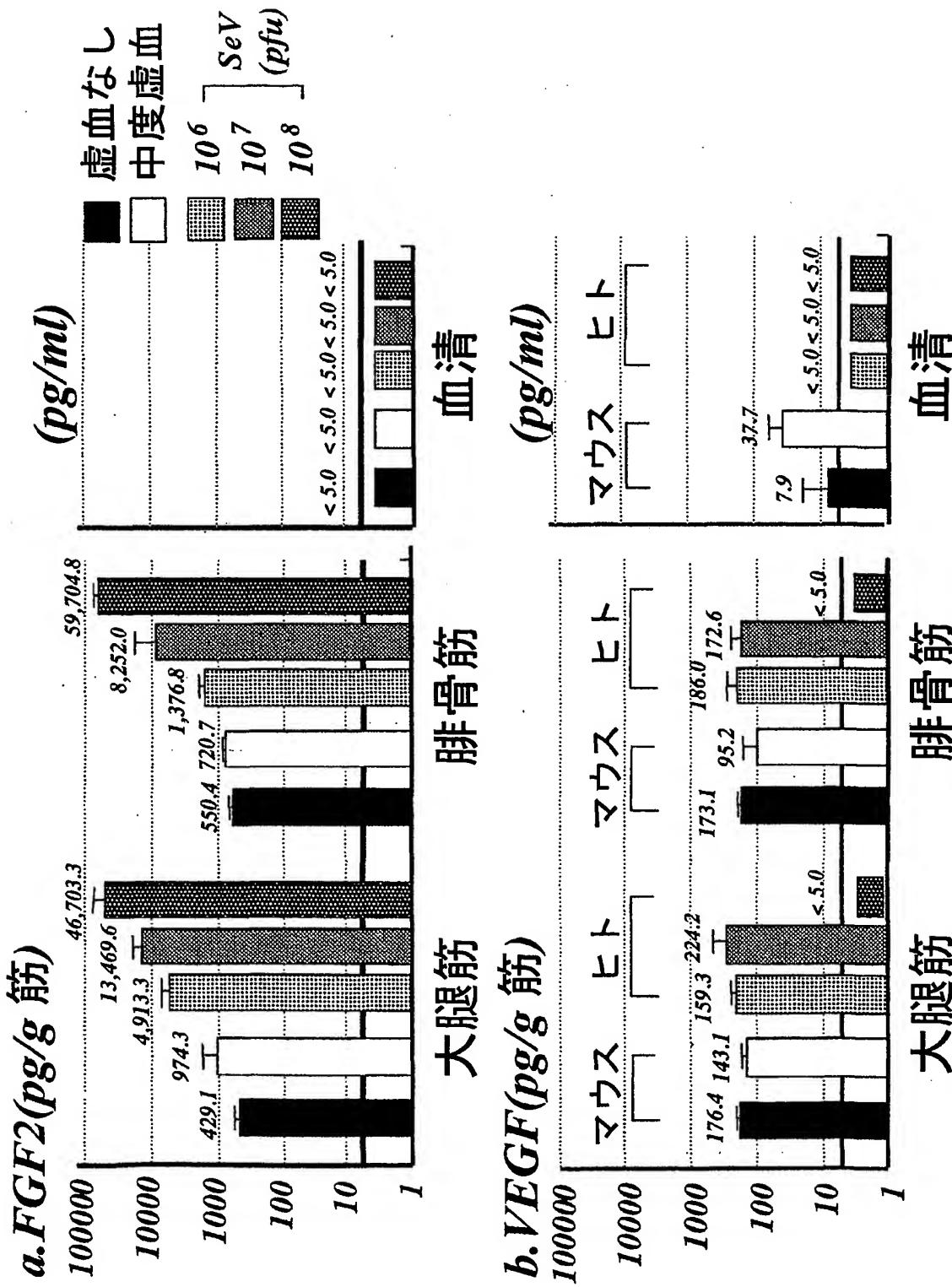
5 / 13

図 5



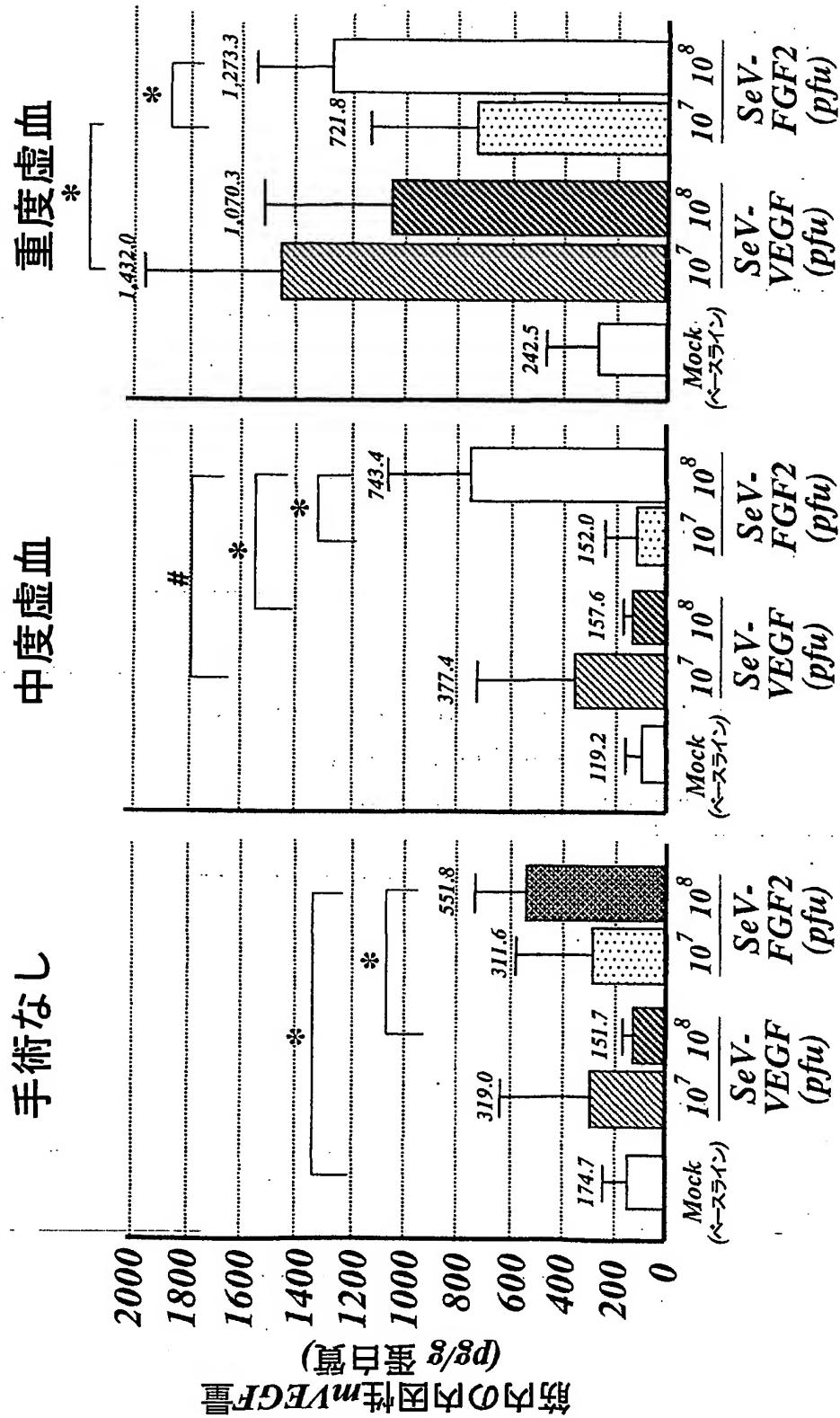
6 / 13

図 6



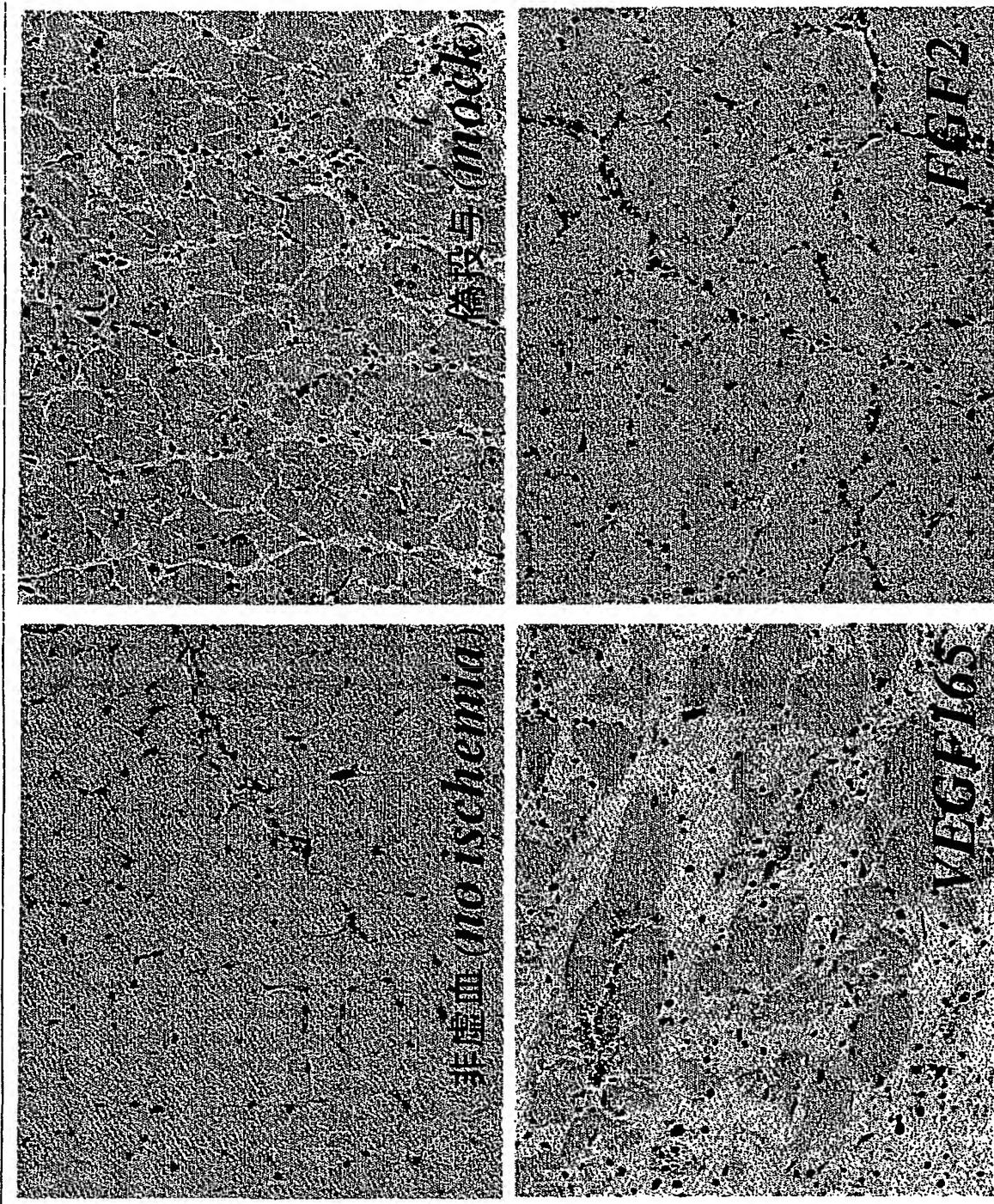
7 / 13

図 7



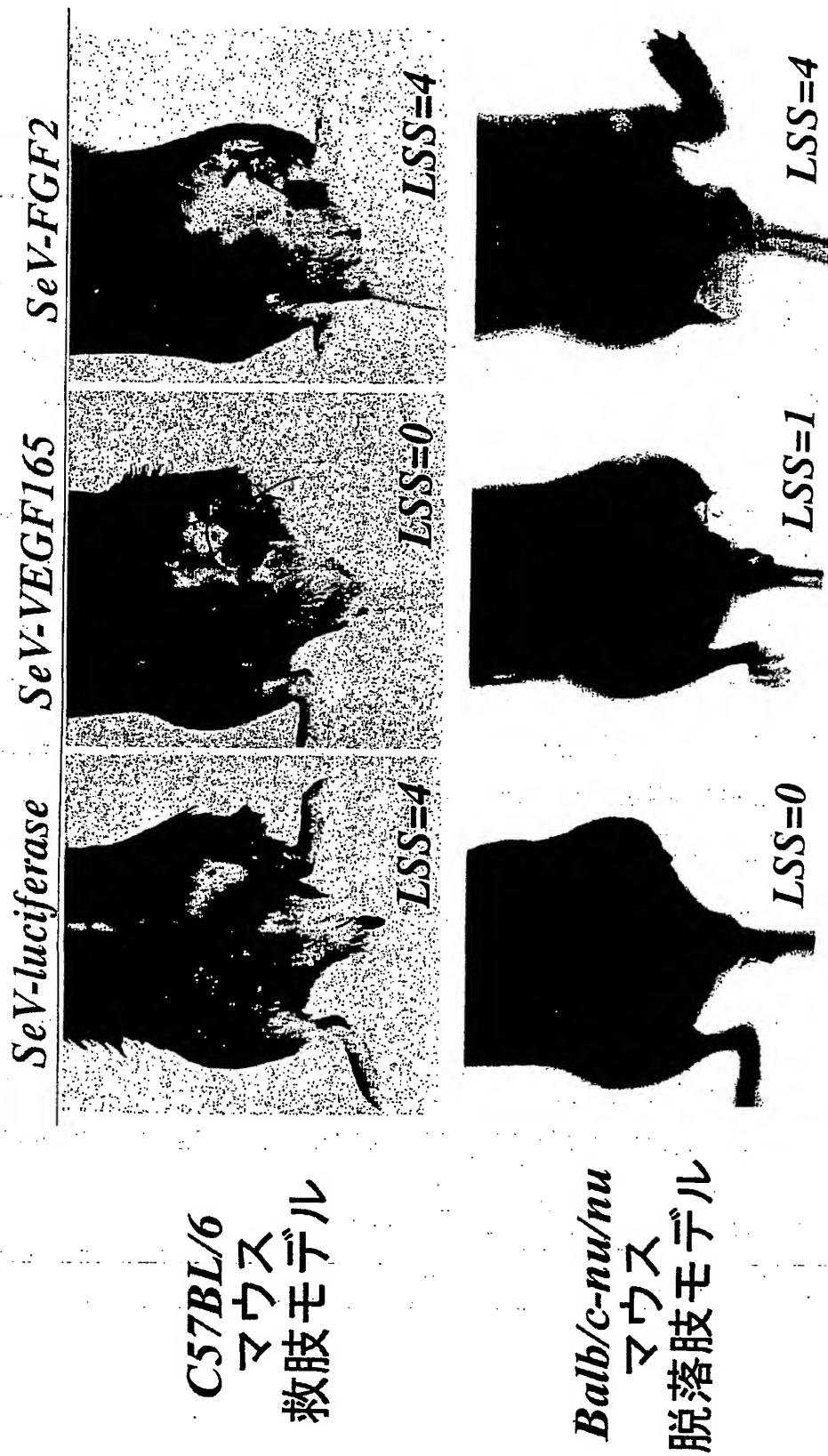
8 / 13

図8



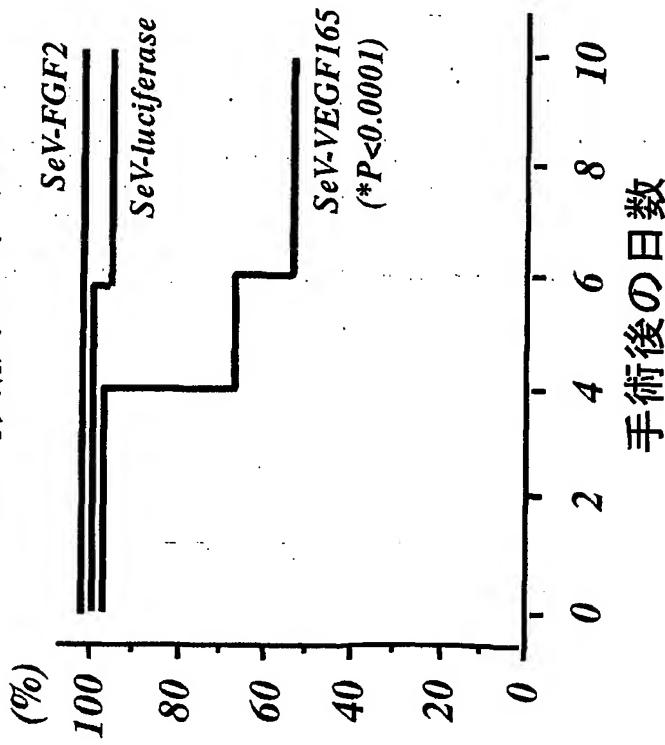
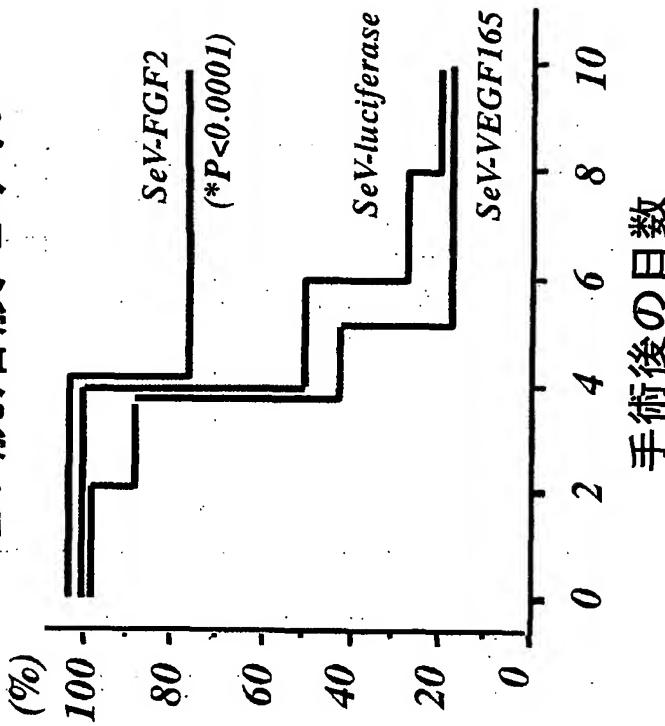
9 / 13

図 9



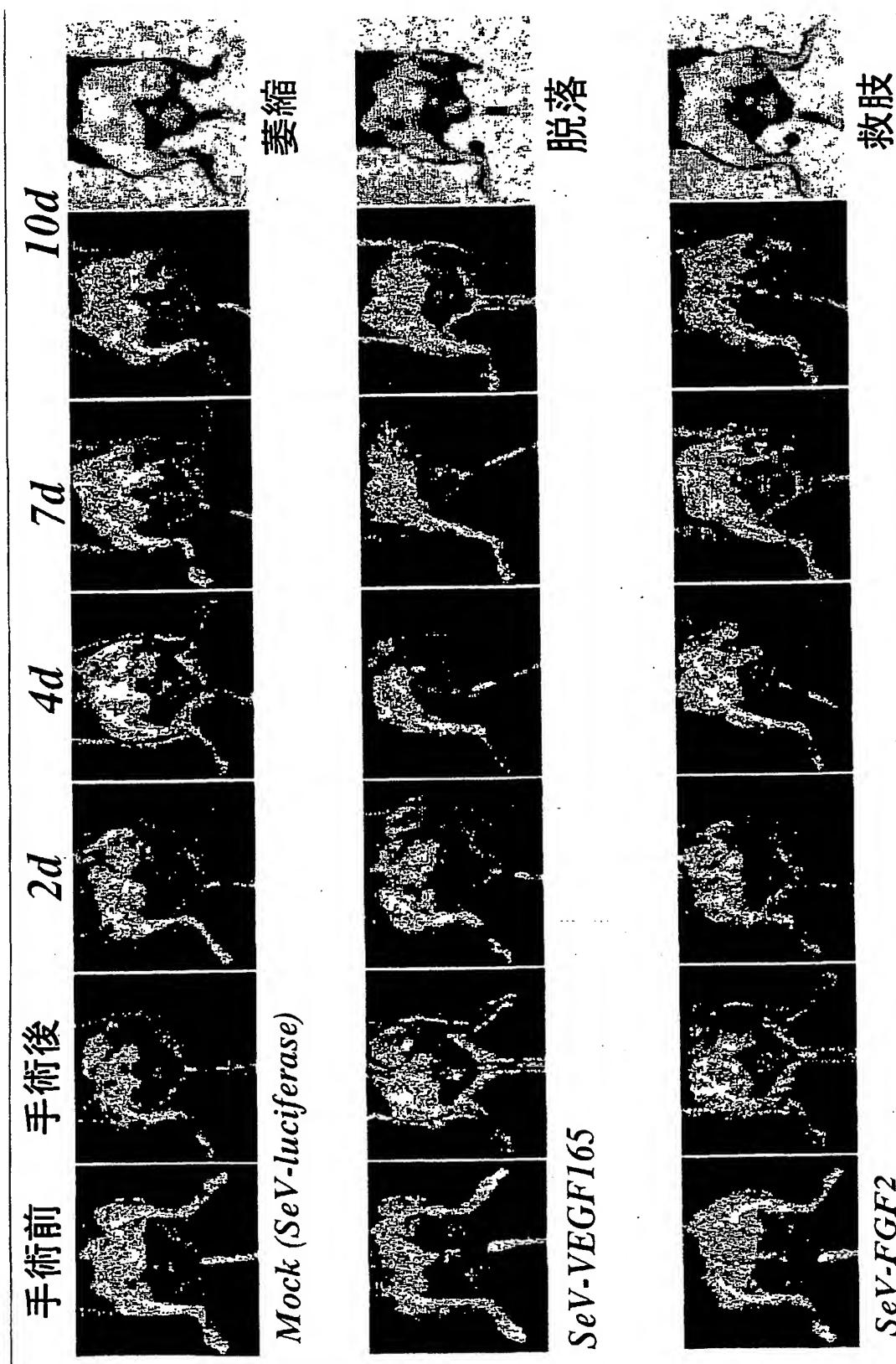
10 / 13

図 10

**A. 救肢モデル****B. 脱落肢モデル**

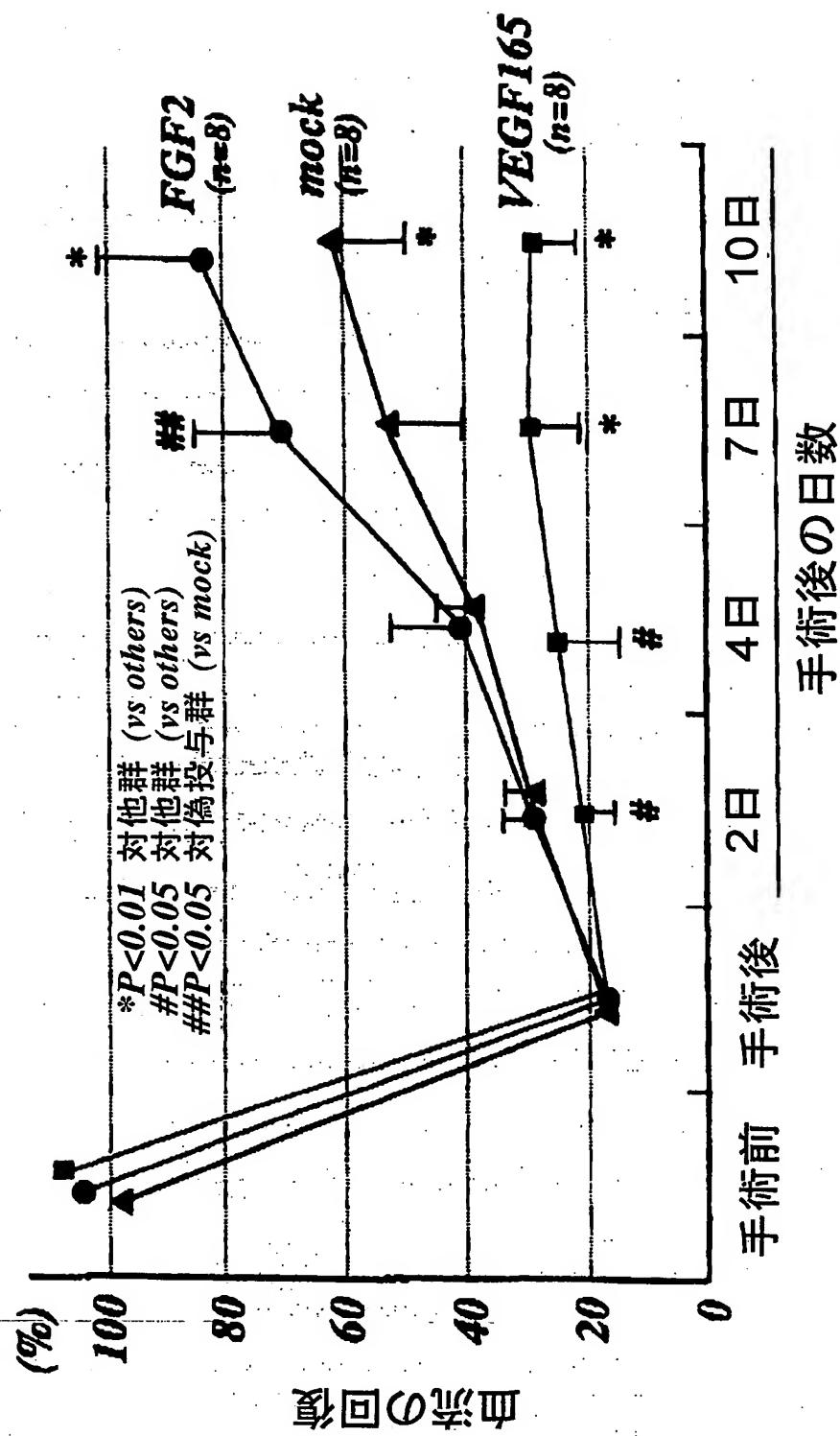
11 / 13

図 11



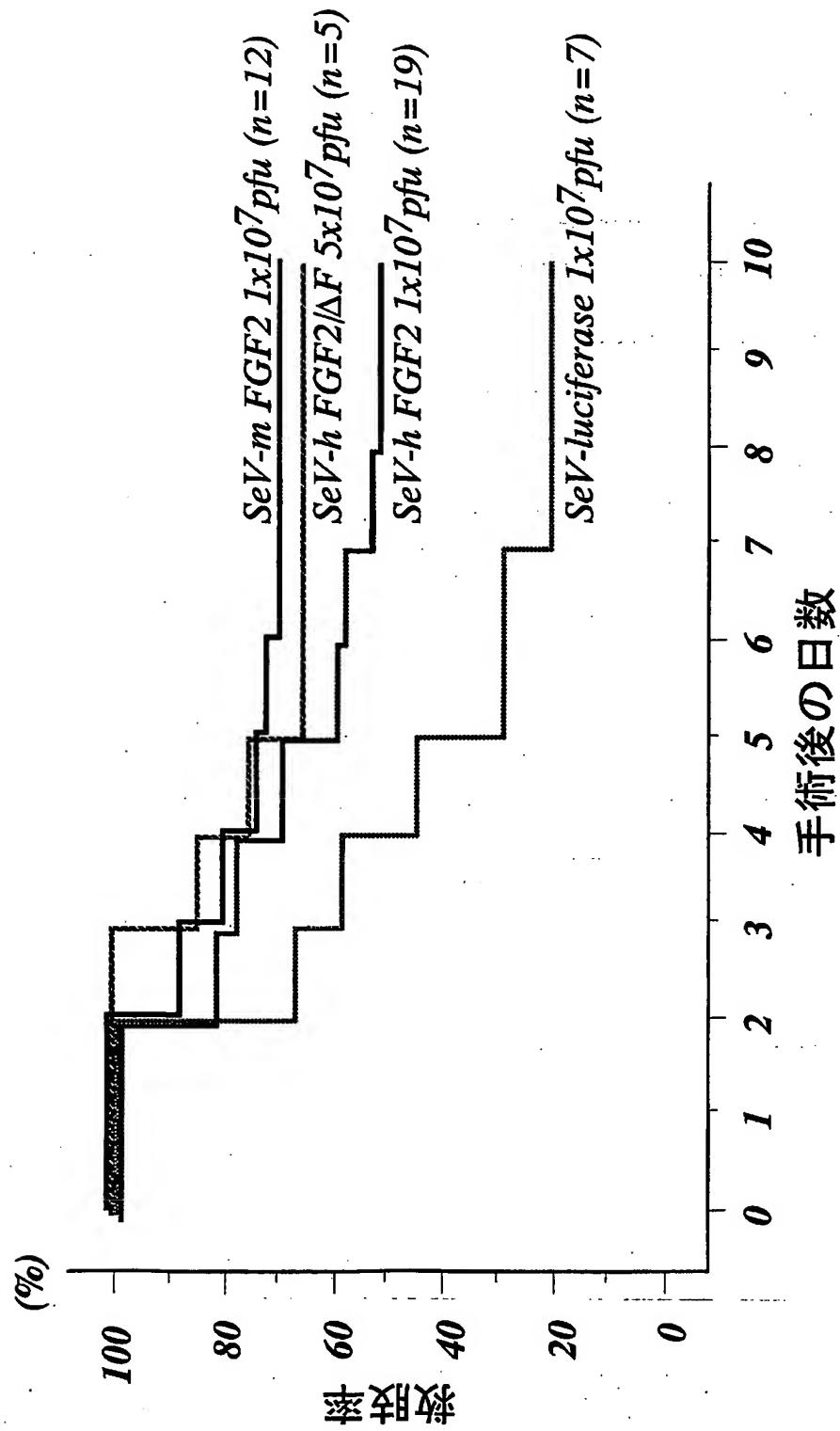
12 / 13

図 12



13 / 13

図 13



## SEQUENCE LISTING

<110> DNAVEC Research Inc.

<120> Paramyxovirus vectors encoding angiogenic genes and uses  
thereof

<130> D3-A0006P

<140>

<141>

<150> JP 2000-359374

<151> 2000-11-27

<160> 19

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 10

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Artificially

## Synthesized Sequence

&lt;400&gt; 1

ctttcaccct

10

&lt;210&gt; 2

&lt;211&gt; 15

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence: Artificially

Synthesized Sequence

&lt;400&gt; 2

tttttcttac tacgg

15

&lt;210&gt; 3

&lt;211&gt; 18

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence: Artificially

Synthesized Sequence

<400> 3

cggccgcaga tcttcacg

18

<210> 4

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Artificially  
Synthesized Sequence

<400> 4

atgcatgccg gcagatga

18

<210> 5

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Artificially  
Synthesized Primer Sequence

<400> 5

gtttagtact gcaagagc

18

<210> 6

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Artificially  
Synthesized Primer Sequence

<400> 6

tttgccggca tgcatgttgc ccaaggggag agttttgcaa cc 42

<210> 7

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Artificially  
Synthesized Primer Sequence

<400> 7

atgcatgccg gcagatga 18

<210> 8

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Artificially  
Synthesized Primer Sequence

<400> 8

tgggtgaatg agagaatcag c

21

<210> 9

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially  
synthesized sequence

<400> 9

atgcatatgg tcatgcggtt ttggcagtac

30

<210> 10

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially synthesized sequence

<400> 10

tgcggctat tattacttgt acagctcgtc 30

<210> 11

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially synthesized sequence

<400> 11

gtttaccagg tggagagttt tgcaaccaag cac 33

<210> 12

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially synthesized sequence

<400> 12

ctttcacctg gtacaaggcac agatcatgga tgg 33

<210> 13

<211> 84

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially synthesized sequence

<400> 13

atccgcggcc gccaaagtgc acttatggca gcccggagca tcaccacgct gcccccttg 60  
cccgaggatg gcggcagcgg cgcc 84

<210> 14

<211> 82

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially synthesized sequence

<400> 14

atccgcggcc gcgatgaact ttcaccctaa gttttctta ctacggtcag ctcttagcag 60  
acatttggaaag aaaaagtata gc 82

<210> 15

<211> 57

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Artificially  
Synthesized Primer Sequence

<400> 15

acgtgcggcc gccaaaggta atccaccatg gctgccagcg gcatcacctc gcttccc 57

<210> 16

<211> 103

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Artificially

## Synthesized Primer Sequence

&lt;400&gt; 16

acgtgcggcc gcgatgaact ttcaccctaa gttttctta ctacgcggat cagctcttag 60  
cagacattgg aagaaacagt atggccttct gtccaggtcc cgt 103

&lt;210&gt; 17

&lt;211&gt; 21

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence: Artificially

Synthesized Primer Sequence

&lt;400&gt; 17

tgcacccacg acagaagggg a 21

&lt;210&gt; 18

&lt;211&gt; 22

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence: Artificially

Synthesized Primer Sequence

<400> 18

tcaccgcctt ggcttgtcac at 22

<210> 19

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Artificially

Synthesized Primer Sequence

<400> 19

ctaccaaaag tttcccaggc ag 22

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP01/10323

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER  
Int.Cl<sup>7</sup> C12N15/86, A61K48/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)  
Int.Cl<sup>7</sup> C12N15/86, A61K48/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)  
MEDLINE (STN), WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
PA	Ichiro MISAKI et al., "Recombinant Sendai virus-mediated gene transfer to vasculature: a new class of efficient gene transfer vector to the vascular system", FASEB J., May, 2001, Vol.15, No.7, pages 1294 to 1296	1-7
PA	Shinichi YOSHIMURA et al., "FGF-2 regulation of neurogenesis in adult hippocampus after brain injury", PNAS, May, 2001, Vol.98, No.10, pages 5874 to 5879	1-7
A	Bernhard V. SAUTER et al., "Adenovirus-mediated gene transfer of endostatin in vivo results in high level of transgene expression and inhibition of tumor growth and metastases", PNAS, April, 2000, Vol.97, No.9, pages 4802 to 4807	1-7
A	Yuko SAKAI et al., "Accommodation of foreign genes into Sendai virus genome: sizes of inserted genes and viral replication", FEBS Letters, (1999), Vol.456, pages 221 to 226	1-7

 Further documents are listed in the continuation of Box C.  See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"E" earlier document but published on or after the international filing date	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"&" document member of the same patent family
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search 18 February, 2002 (18.02.02)	Date of mailing of the international search report 05 March, 2002 (05.03.02)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP01/10323

## C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Yasufumi KANEDA et al., "Gene Therapy of Cardiovascular Disorders", Human Cell, (1999), Vol.12, No.3, pages 109 to 114	1-7
A	Mahiko NAKANISHI et al., "Gene transfer vectors based on Sendai virus", J. Control Release, (1998), Vol.54, No.1, pages 61 to 68	1-7
A	WO 95/25803 A1 (Rhone-Poulenc Rorer S.A.), 28 September, 1995 (28.09.1995), & JP 9-510357 A	1-7
A	WO 91/09610 A1 (Farmitalia Carlo Erba S.R.L.), 11 July, 1991 (11.07.1991), & JP 4-504581 A	1-7

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

PCT/JP01/10323

**Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1.  Claims Nos.: 8  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:  
  
It involves methods for treatment of the human body by therapy too.
2.  Claims Nos.:  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3.  Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

**Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)**

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1.  As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2.  As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3.  As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4.  No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest     The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.  
                             No protest accompanied the payment of additional search fees.

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC））  
Int.Cl' C12N15/86, A61K48/00

## B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料（国際特許分類（IPC））  
Int.Cl' C12N15/86, A61K48/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語）

MEDLINE (STN), WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG)

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
P A	Ichiro MISAKI et al., Recombinant Sendai virus-mediated gene transfer to vasculature: a new class of efficient gene transfer vector to the vascular system., FASEB J. May 2001, Vol. 15, No. 7, p. 1294-1296	1-7
P A	Shinichi YOSHIMURA et al., FGF-2 regulation of neurogenesis in adult hippocampus after brain injury., PNAS May 2001, Vol. 98, No. 10, p. 5874-5879	1-7

C欄の続きにも文献が列挙されている。

パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）

「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

## の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

18. 02. 02

国際調査報告の発送日

05.03.02

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官（権限のある職員）

本間 夏子

4 N 9637



電話番号 03-3581-1101 内線 3488

## C(続き) 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	Bernhard V. SAUTER et al., Adenovirus-mediated gene transfer of endostatin <i>in vivo</i> results in high level of transgene expression and inhibition of tumor growth and metastases., PNAS April 2000, Vol. 97, No. 9, p. 4802-4807	1-7
A	Yuko SAKAI et al., Accommodation of foreign genes into Sendai virus genome: sizes of inserted genes and viral replication., FEBS Letters 1999, Vol. 456, p. 221-226	1-7
A	Yasufumi KANEDA et al., Gene Therapy of Cardiovascular Disorders, HUMAN CELL 1999, Vol. 12, No. 3, p. 109-114	1-7
A	Mahiko NAKANISHI et al., Gene transfer vectors based on Sendai virus., J. Control. Release 1998, Vol. 54, No. 1, p. 61-68	1-7
A	WO 95/25803 A1 (ローラン・モレ・ソシエ・アノニム) 1995.09.28 & JP 9-510357 A	1-7
A	WO 91/09610 A1 (アルミタリア・カルロ・エルバ・エッセ・エル・エル) 1991.07.11 & JP 4-504581 A	1-7

**第I欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見（第1ページの2の続き）**

法第8条第3項（PCT第17条(2)(a)）の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1.  請求の範囲 8 は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。  
つまり、  
人の治療方法も含有するものである。

2.  請求の範囲 \_\_\_\_\_ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、

3.  請求の範囲 \_\_\_\_\_ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

**第II欄 発明の単一性が欠如しているときの意見（第1ページの3の続き）**

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

1.  出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2.  追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3.  出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4.  出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

**追加調査手数料の異議の申立てに関する注意**

- 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。  
 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。

## DESCRIPTION

## PARAMYXOVIRUS VECTOR ENCODING ANGIOGENESIS GENE AND USE THEREOF

Technical Field

5 The present invention relates to Paramyxovirus vectors encoding angiogenesis genes and use thereof.

Background Art

Recent research for treatment of ischemic diseases has been performed using growth factors that induce angiogenesis. For example, the therapeutic effect of fibroblast growth factor 2 (FGF2) (Baffour, R. et al., J. Vasc. Surg. 16 (2): 181-91, 1992) and endothelial cell growth factor (ECGF) (Pu, L. Q. et al., J. Surg. Res. 54 (6): 575-83, 1993) on patients with cardiac infarction and acute limb ischemia has been examined. A recent study has revealed that vascular endothelial growth factor (VEGF) / vascular permeability factor (VPF) promotes vasculogenesis in animal models with myocardial ischemia and limb ischemia (Takeshita, S. et al., Circulation 90 (5 Pt 2): II228-34, 1994; Takeshita, S. et al., J. Clin. Invest. 93 (2): 662-70, 1994).

Clinical trials of human gene therapy using angiogenic growth factors have been undertaken recently. Human gene therapy has been clinically applied to therapeutic angiogenesis in order to treat critical ischemic limb. Vascular endothelial growth factor / vascular permeability factor (VEGF/VPF), an endothelial cell-specific mitogen, is a potent therapeutic gene for this purpose, and it has demonstrated relatively promising results by means of plasmid-based gene transfer involving human subjects (Baumgartner, I., et al., Circulation 97, 1114-1123 (1998); Isner, J. M., et al., J. Vasc. Surg. 28, 964-973 (1998)). However, the related adverse effects and toxicity levels of intramuscular gene transfer of VEGF have been less documented at present because efficiency of plasmid-mediated intramuscular gene transfer and expression are not very high. Since recent reports indicate that transgenic (Thurston, G., et al., Science 286, 2511-2514 (1999)) or adenoviral (Thurston, G., et al., Nature Med. 6, 460-463 (2000)) overexpression of VEGF

result in abnormal vasculogenesis in transgene-introduced animals, and that plasmid-based intramuscular VEGF gene transfer showed transient edema in human subjects with ischemic limb (Baumgartner, I., et al., Circulation 97, 1114-1123 (1998); Isner, J. M., et al., 5 J. Vasc. Surg. 28, 964-973 (1998)), detailed mechanisms to cause these pathologies remain to be clarified. Other potential unfavorable effects of VEGF over expression are likely to be the formation of "angioma-like" fragile capillary vessels, possibly due to the imbalance of angiogenic signals (Carmeliet, P., Nature Med. 10 6, 1102-1103 (2000)). VEGF gene transfer to vessel wall *in vivo* may cause angiomaticousid endothelial proliferation in the severe neointimal formation associatingextravasation of red blood cells (Yonemitsu, Y., et al., Lab. Invest. 75, 313-323 (1996)). Similar pathological findings were demonstrated in retrovirus-mediated 15 constitutive overexpression of VEGF in myocardium (Lee, R. J., et al., Circulation 102, 898-901 (2000)). Furthermore, another important issue to be addressed in clinical setting is the level of leakage of locally expressed these angiogenic factors to systemic circulation. Such leakage may cause unexpected angiogenic 20 complications associated with diabetic retinopathy or growth of neoplasm.

Acute critical limb ischemia, which results from acute obstruction of the major arteries, is caused mainly by thrombotic obstruction and is an important target of therapeutic angiogenesis. 25 Acute critical limb ischemia is treated quite unsuccessfully in late interventions, often resulting in limb amputation. Moreover, the long-term prognosis of patients with limb amputation is poor and one-year survival rates of patients after surgery is only 50%. Plasmid-based gene expression levels are low and the efficacy of 30 plasmid-based therapy for acute severe artery occlusion is still unknown.

#### Disclosure of the Invention

An objective of the present invention is to provide 35 Paramyxovirus vectors encoding angiogenic genes and use thereof. More specifically, the present invention provides Paramyxovirus

vectors encoding angiogenic genes, angiogenic compositions including the vectors, and methods for promoting angiogenesis in ischemic tissues using the vectors.

Preliminary studies by the present inventors indicated 5 unsuccessful results wherein limb salvage was achieved by means of plasmid-based human VEGF165 gene transfer in mouse model of acute critical limb ischemia (data not shown). To test whether higher expression of transgene may show a better result, the present inventors used recombinant Sendai virus (SeV)-mediated gene 10 transfer, a technique that shows highly efficient gene transfer into various organs. As shown in Examples of this application, the present inventors used two recombinant SeV vectors as therapeutic tools for limb ischemia: one expressing human VEGF165 and the other expressing murine fibroblast growth factor 2 (FGF2). FGF2 (often referred to 15 as bFGF) protein is a growth factor that shows angiogenic effect when administrated (Baffour, R. et al., J. Vasc. Surg. 16: 181-191 (1992)).

Using these vectors, the present inventors analyzed 1) the transgene expression level and kinetics of SeV-mediated 20 intramuscular gene transfer; 2) whether higher expression of angiogenic factors may prevent limb necrosis caused by acute critical limb ischemia or any adverse effects; and 3) whether the higher expression of angiogenic proteins in muscles leads to their leakage 25 into the systemic circulation.

The inventors used ischemic mouse models including BALB/c nu/nu lower limb amputation models (auto-amputation model), in which the entire external iliac artery and vein and femoral artery and vein 30 above the knee were excised (critical ischemia model), and C57BL/6 limb salvage models, which do not lose their lower limbs due to physiological angiogenesis after the same surgical procedures as above. Vectors expressing human VEGF165, mouse FGF2, or luciferase (SeV-hVEGF165, SeV-mFGF2, or SeV-luciferase, respectively) were constructed and administered to thigh and calf muscles two days before ischemia surgery. Lower limbs were observed up to 10 days 35 after surgery.

In the case of luciferase gene transfer into mouse lower limb skeletal muscle, SeV showed 5- to 120-fold higher gene expression levels compared to control plasmid vectors that were administered in an amount of 100 µg (200 mg/60 kg human body weight: corresponding 5 to 25 to 50 fold of the clinical dose). In various cell cultures, both SeV-hVEGF165 and SeV-mFGF2 showed high protein secretion level (50 to 500 ng/10<sup>5</sup> cells/24 hours). FGF2 level was increased by 5 to 100 fold by intramuscular administration of SeV-mFGF2 compared with non-administered control (base line). In contrast, the 10 administration of SeV-hVEGF165 caused only limited expression of VEGF in muscle (at most 2 fold above base line) and significantly increased the expression of endogenous VEGF. Widespread necrosis was observed in muscle tissues where SeV-hVEGF165 was administered 15 2 days after administration and promoted the amputation of lower limbs. On the other hand, SeV-mFGF2 administration showed significant therapeutic effect of limb salvage with an increase in endogenous VEGF expression. In both cases, no significant leakage of vector-derived proteins into the serum was observed (<5 pg/ml). All of the limbs were saved in the non-administered, SeV-luciferase, 20 and SeV-mFGF2 groups, however, one third or more of the SeV-hVEGF group mice in the limb salvage model lost their lower limbs. In the auto-amputation model, only the FGF2 group showed a high limb salvage effect, however, the lower limbs of most of the mice in other groups was auto-amputated.

The present invention revealed that intramuscular administration of recombinant Sendai virus vectors significantly increased transgene expression. Recombinant Sendai virus vectors showed 10- to 100-fold higher expression than plasmid vectors. However, it was found that *in vitro* administration of recombinant 30 Sendai virus vectors expressing VEGF165 promoted limb amputation in the acute severe ischemia mouse model. Administration of SeV-hVEGF165 induced edema (Example 4, Fig. 8), prevented blood perfusion after ischemic surgery (Example 5, Figs. 11 and 12), and significantly increased the ratio of limb amputation by ischemia 35 (Example 5, Figs. 9 and 10). These pathologies would be partly due to strong vascular permeability increasing activity of VEGF. In

contrast, administration of Sendai virus expressing FGF2 consistently showed high therapeutic effect. In both models, the fact that no recombinant proteins were detected in the systemic circulatory system, suggests that SeV-mediated FGF2 therapy has little effects to other organs and broad safety regions. These results also indicate that attention must be paid to undesirable effects caused by VEGF in certain limb conditions in human clinical applications. Thus, FGF2 gene therapy, which shows a broad range of safety and therapeutic effect, would be a safe gene therapy system.

Furthermore, the present invention demonstrated the effect of SeV vector, which is a potent tool for introducing therapeutic genes *in vivo*, and enables its use in clinical therapy for acute severe ischemic limb.

The present invention relates to Paramyxovirus vectors encoding angiogenic genes and use thereof. More specifically, the present invention relates to:

- (1) a Paramyxovirus vector encoding an angiogenic gene capable of being expressed;
- (2) the Paramyxovirus vector of (1), wherein the angiogenic gene is fibroblast growth factor 2 (FGF2);
- (3) the Paramyxovirus vector of (1), wherein the Paramyxovirus is Sendai virus;
- (4) the Paramyxovirus vector of (1), wherein said vector lacks the F gene;
- (5) an angiogenic composition comprising the Paramyxovirus vector of (1) or a cell containing the vector, and a pharmaceutically acceptable carrier;
- (6) the composition of (5), wherein said composition is for the treatment of ischemic tissues;
- (7) the composition of (5), wherein said composition is for intramuscular administration; and
- (8) a method for inducing angiogenesis, wherein said method comprises the step of administering the angiogenic composition of any one of (5) to (7).

Using recombinant SeV as a powerful tool for boosting therapeutic genes in muscles, the present inventors characterized *in vivo* effect of angiogenic factors, VEGF165 and FGF2, for acute severe limb ischemia. Key aspects obtained in this study were; 1) limb ischemia-induced endogenous VEGF rather diffused to systemic circulation than concentrated in muscles and the expression of VEGF165 mediated by the vector of the present invention does not leak significantly to systemic circulation; 2) exogenous FGF2 expression 5- to 100-fold higher than endogenous one did not result in significant systemic diffusion; 3) this level of FGF2 expression also induces endogenous VEGF expression and showed significant limb salvaging effect associating significantly increased limb blood perfusion; and 4) overexpression of VEGF165 apparently induced the limb damage in contrast to that of FGF2. These findings suggest the clinical feasibility of FGF2 with broader safety range as a therapeutic angiogenic factor to treat acute critical limb ischemia. Furthermore, the present inventors are the first to reveal severe adverse effect of VEGF165 gene transfer for limb ischemia.

Interestingly, the present inventors found that limb ischemia-induced endogenous VEGF rather diffused to systemic circulation than concentrated in muscle itself. Although ischemic operation-induced endogenous VEGF expression in muscles and endothelial cells (ECs) was already addressed (Florkiewicz, R. Z. et al., J. Cell. Physiol. 162, 388-399 (1995)), the present inventors are the first to demonstrate that endogenous VEGF seems responsible for the induction of systemic, but not for local, angiogenic response. Asahara et al. showed that systemic administration of VEGF mobilizes endothelial progenitor cells (EPCs) (Asahara, T. et al., EMBO J. 18, 3964-3972 (1999)), suggesting that physiological response to limb ischemia forming collateral vessels is appeared to depend on, to some extent, EPC-mediated "vasculogenesis-like" neovascularization rather than on local angiogenesis by proliferating ECs sprouting from preexisting vessels (Isner J. M., J. Clin. Invest. 106, 615-619 (2000)). Since boosted VEGF in ischemic limb via gene transfer resulted in lack of significant blood perfusion and in limb amputation as demonstrated here, in this case,

VEGF may dominantly act as "vascular permeability factor" rather than "angiogenic factor". This may be also supported by the histology of muscles, apparently indicating more extensive intermuscular edema in VEGF165 group.

5 Secondary, the present inventors showed that FGF2 gene therapy solely is effective to treat ischemic limb, and involves endogenous VEGF function *in vivo*. Even if the total protein concentration of VEGF in muscle via FGF2 gene transfer was similar to that of VEGF gene transfer, FGF2 gene therapy itself, but not VEGF, was  
10 sufficiently effective. These findings suggest that not only VEGF but also FGF2 may be necessary to form mature blood vessels for therapeutically perfusing blood to ischemic limbs and to prevent vascular leakage. Furthermore, angiopoietin-1, an angiogenic factor that prevents vascular leakage of VEGF-induced immature vessels, may  
15 contribute to this.

The reason why injection of SeV-VEGF165 could not show comparable expression to SeV-FGF2 or SeV-luciferase in muscle *in vivo* is not still fully addressed because SeV-VEGF165 works *in vitro* sufficiently to secrete gene product similar to SeV-FGF2. Similar  
20 to histological study, laser Doppler perfusion imaging (LDPI) showed extensively damaged muscular tissue with lack of blood perfusion. Thus, it may be possible that cellular machinery of SeV-mediated transcription including tubulin (Moyer, S. A., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83, 5405-5409 (1986)) and phosphoglycerate  
25 kinase (Ogino, T., et al., J. Biol. Chem. 274, 35999-36008 (1999)), may be disturbed due to edema caused by VEGF165-induced tissue damage. Inversely, relatively low level of exogenous VEGF165 gene expression markedly enhanced endogenous VEGF (approximately 200 pg/g muscle) in severely ischemic muscles (1,400 pg/g muscle), resulting  
30 in accelerated limb amputation. These results strongly suggest that enhanced concentration of VEGF in muscle, even if it is relatively low and around 2-fold higher than the baseline, can lead limbs to critical limb ischemia.

Angiogenesis is considered as a well-harmonized process and a  
35 lot of factors may be involved. Among these factors, the biological function of VEGF is highly dose-dependent, resulting in fatal defect

even with single loss of allele (Carmeliet, P. et al., *Nature* 380, 435-439 (1996)). Constitutive VEGF expression is necessary during entire process of vascular integrity and maturation, because transient VEGF expression only induces short-lived angiogenic 5 responses (Pettersson, A. et al., *Lab. Invest.* 80, 99-115 (2000)), and further, VEGF-induced capillary-like structure rarely makes connections to preexisting blood vessels (Springer, M. L., et al., *Mol. Cell* 2, 549-558 (1998)). Thus, the present invention suggests that more than 2-fold higher concentration of VEGF in muscle without 10 sufficient FGF2 is likely to be seriously toxic. Considering these, more careful attention than ever should be paid in use of VEGF for therapeutic angiogenesis, although VEGF still holds great clinical potential. Furthermore, intramuscular FGF2 gene transfer was demonstrated to be safe and significantly therapeutically effective 15 for limb salvage in acute severe limb ischemia cases.

Herein, a "Paramyxovirus vector" is defined as a vector (or carrier) that is derived from the Paramyxovirus and that is used for gene transfer to host cells. The Paramyxovirus vector of the present invention may be ribonucleoprotein (RNP) or a virus particle having 20 infectivity. Herein, the term "infectivity" is defined as an ability of the recombinant Paramyxovirus vector to transfer, through its cell adhesion and membrane fusion abilities, a gene contained in the vector to cells to which the vector is adhered. The Paramyxovirus vector of the present invention may have replication ability, or may 25 be a defective vector without the replication ability. Herein, "replication ability" is defined as the ability of virus vectors to replicate and produce infective virus particles in host cells infected with the virus vectors. The replication ability can be determined using, for example, monkey kidney-derived cell line, 30 LLC-MK2 or CV-1.

Herein, a "recombinant" Paramyxovirus vector is defined as a Paramyxovirus vector constructed by gene engineering or its amplified products. For instance, recombinant Paramyxovirus vectors can be generated by reconstitution of a recombinant Paramyxovirus 35 cDNA.

Herein, a Paramyxovirus is defined as a virus of the *Paramyxoviridae* family or a derivative thereof. Paramyxoviruses used in the present invention include, for example, viruses belonging to the *Paramyxoviridae* such as Sendai virus, Newcastle disease virus, 5 Mumps virus, Measles virus, Respiratory syncytial virus, rinderpest virus, distemper virus, simian parainfluenza virus (SV5), and type I, II, and III human parainfluenza virus. The virus of the present invention may be preferably a virus of the genus *Paramyxovirus* or a derivative thereof. Paramyxovirus that can be used in the present 10 invention includes, for example, type I human parainfluenza virus (HPIV-1), type III human parainfluenza virus (HPIV-3), type III bovine parainfluenza virus (BPIV-3), Sendai virus (also referred to as "type I mouse parainfluenza virus"), type X simian parainfluenza virus (SPIV-10), etc. Most preferable Paramyxovirus of the invention 15 is Sendai virus. These viruses may be naturally occurring, wild-type, mutant, laboratory-passaged, artificially constructed strains, etc. Incomplete viruses such as the DI particle (Willenbrink W. and Neubert W. J., J. Virol., 1994, 68, 8413-8417) and synthesized oligonucleotides may also be utilized as a material 20 for generating the virus vector of the present invention.

Genes encoding proteins of a Paramyxovirus include NP, P, M, F, HN, and L genes. Herein, the "NP, P, M, F, HN, and L genes" represent those encoding the nucleocapsid protein, phosphoprotein, matrix protein, fusion protein, hemagglutinin-neuraminidase, and 25 large protein, respectively. Genes of each virus of the subfamily Paramyxovirus are described generally as follows. In general, NP gene may also be indicated as "N gene".

Paramyxovirus	NP	P/C/V	M	F	HN	-	L
Rublivirus	NP	P/V	M	F	HN	(SH)	L
Morbillivirus	NP	P/C/V	M	F	H	-	L

For instance, the accession numbers of each gene of the Sendai 30 virus classified as a Respirovirus of *Paramyxoviridae* in the nucleotide sequence database, are M29343, M30202, M30203, M30204, M51331, M55565, M69046, and X17218 for NP gene; M30202, M30203, M30204, M55565, M69046, X00583, X17007, and X17008 for P gene;

D11446, K02742, M30202, M30203, M30204, M69046, U31956, X00584, and X53056 for M gene; D00152, D11446, D17334, D17335, M30202, M30203, M30204, M69046, X00152, and X02131 for F gene; D26475, M12397, M30202, M30203, M30204, M69046, X00586, X02808, and X56131 for HN gene; and D00053, M30202, M30203, M30204, M69040, X00587, and X58886 for L gene.

As used herein, the term "gene" refers to a genetic substance, including nucleic acids such as RNA and DNA, which may or may not encode a protein. A gene may encode a functional RNA such as ribozyme or antisense RNA. It can be a naturally occurring sequence or an artificially designed sequence. Furthermore, as used herein, the term "DNA" includes a single-stranded DNA and a double-stranded DNA.

The present invention provides a Paramyxovirus vector encoding angiogenic gene and use of the same. The present inventors showed that transgene expression was increased at the administered sites where a Paramyxovirus vector encoding an angiogenic gene was administrated intramuscularly *in vivo*. The present inventors revealed that necrosis in ischemic tissues could be prevented by the administration of a recombinant Paramyxovirus vector encoding an angiogenic gene (FGF2) and loss of the hind limb could be prevented in a limb salvage experiment using mice with ischemic hind limbs. Vectors of this invention are useful in effectively inducing angiogenesis in ischemic tissues and in preventing necrosis, and can thus be preferably used for gene therapy for ischemic diseases.

Moreover, the present inventors revealed that genes administered intramuscularly using recombinant Paramyxovirus vectors could be continuously expressed for 1 to 2 weeks. This result indicates that gene therapy with angiogenic factors using recombinant Paramyxovirus vectors can achieve continuous therapeutic effects. Moreover, angiogenic factors expressed from recombinant Paramyxovirus vectors administered intramuscularly could not be detected in the systemic circulatory system and, thus, would not cause undesirable effects outside of the target tissues. Therefore, the findings of the present invention that Paramyxovirus vectors have various benefits in angiogenic gene transfer suggest

possible great improvement in gene therapy by specifically targeting ischemic tissues.

Since Paramyxovirus vectors are not pathogenic in humans, they can be suggested to be preferably utilized in clinical trials of human gene therapy in view of safety. It is a major obstacle in high efficient gene transfer that, in most cases, introduced DNA must be transported into the nucleus or nuclear membrane must be eliminated for the expression of an exogenous gene via plasmid DNA or such. In the case of Sendai virus, however, expression of an exogenous gene is driven by both cellular tubulin and its RNA polymerase (L protein) in the cytoplasm when viruses replicate. This suggests that the Sendai virus does not interact with chromosomes of host cells, which avoids risks such as cancerization and immortalization of cells. Furthermore, the Sendai virus is known to be pathogenic in rodents causing pneumonia, but not in humans, which is supported by studies showing that the intranasal administration of the wild type Sendai virus does not do harm in nonhuman primates (Hurwitz J. L. et al., Vaccine, 1997, 15, 533-540). These features suggest that Sendai virus vector can be utilized in human therapy, and further, support the notion that Sendai virus vectors can be one of the promising tools in gene therapy with angiogenic genes.

Angiogenic genes used herein indicate genes encoding factors, which have activities to promote angiogenesis and/or vasculogenesis directly or indirectly. The factors can be proteins or peptides, or can be nucleic acids such as functional RNAs (ribozymes or antisense RNAs). Angiogenic proteins include, for example, acidic fibroblast growth factor (aFGF), fibroblast growth factor 2 (FGF2) (also called basic fibroblast growth factor (bFGF)), vascular endothelial growth factor (VEGF), angiopoietins (Ang) (including Ang-1 and Ang-2), epidermal growth factor (EGF), transforming growth factor- $\alpha$  (TGF- $\alpha$ ), TGF- $\beta$ , platelet-derived endothelial cell growth factor (PD-ECGF), platelet-derived growth factor (PDGF), tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), hepatocyte growth factor (HGF), insulin-like growth factor (IGF), erythropoietin (EPO), colony-stimulating factor (CSF), macrophage colony-stimulating factor (M-CSF), granulocyte-macrophage colony-stimulating factor

(GM-CSF), interleukin (IL)-8, and nitric oxide synthetase (NOS) (Klagsbrun, M. and D' Amore, P., A. Annu. Rev. Physiol. 53: 217-39, 1991; Folkman, J. and Shing, Y., J. Biol. Chem. 267 (16): 10931-4, 1992; Symes, J. F. and Sniderman, A. D., Curr. Opin. Lipidol. 5 (4): 5 305-12, 1994).

The preferred angiogenic proteins in the present invention include, for example, aFGF, FGF2, Ang-1, Ang-2, EGF, TGF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ , PD-ECGF, PDGF, TNF- $\alpha$ , HGF, IGF, EPO, CSF, M-CSF, GM-CSF, IL-8, and NOS, and the vectors can be constructed using genes encoding the 10 proteins selected from the list above.

Proteins especially preferred among angiogenic proteins used in the present invention are not those which induce premature angiogenesis by VEGF, but those which achieve angiogenesis in which blood vessel is surrounded by parietal cells that are differentiated 15 from the newly generated endothelial cells attached to mesenchymal cells. It is known that vascularization consists of three steps, vasculogenesis, angiogenesis, and vascular maturation. Observations of various transcription factor-knockout studies revealed that maturation in vascularization involves multiple genes. 20 Specifically, transcription factor SCL/tal-1 is mainly involved in vascular formation, and HIF-1, Id, ETS-1, HOXD<sub>3</sub>, COUP-TFII, and MEF2C are involved in angiogenesis. Furthermore, it is known that lung kruppel-like factor (LKLF) or dHAND gene knock out causes embryonic death due to undeveloped parietal cells.

Therefore, angiogenic genes used in the present invention are, more preferably, those that induce transcription factors, including LKLF and dHAND, involved in parietal cell maturation in premature mesenchymal cells. It is predicted that FGF2 stimulation is directly involved in the induction of these transcription factors or promotes 30 proliferation and differentiation of mesenchymal cells through other growth factors such as angiopoietin and HGF.

Angiogenic proteins preferably contain secretion signal sequences that allow the secretion of the angiogenic proteins. However, proteins, such as FGF2 can be secreted outside of cells 35 without a native and typical secretion signal sequence (see Example). These proteins do not necessarily require secretion signal

sequences. The genes encoding these angiogenic proteins, for example, can be obtained by known methods, such as PCR using primers, which are designed, based on the nucleotide sequence information. An example of the most preferred angiogenic factor used in the present invention is FGF2, which shows a stable therapeutic effect in a wide range of expression levels. (Abraham, J. A. et al., 1986, EMBO J. 5: 2523-2528; Moscatelli, D. A. et al., US 4994559; Baird, A. et al., US 5155214; Isner, J. M. US 6121246; WO 97/14307).

Angiogenic genes used for vector construction can be heterologous or homologous to, preferably homologous to, the target individuals for gene transfer in order to achieve a desired effect. Furthermore, angiogenic genes used for vector construction are preferably mammalian angiogenic genes, preferably human genes for application to human.

Paramyxovirus vectors encoding angiogenic genes of the present invention is especially effective for the treatment of ischemic tissues. Namely, gene transfer of angiogenic genes using the vectors of the present invention can promote angiogenesis and prevent necrosis due to ischemia. The ischemic tissues used for the present invention are not limited so long as the tissues show ischemia or are developing ischemia. For example, such tissues include muscle, brain, kidney, and lung. The ischemic diseases treated by administering vectors of the present invention include cerebrovascular ischemia, kidney ischemia, lung ischemia, limb ischemia, ischemic cardiomyopathy, and myocardial ischemia. Treatment of ischemic tissues in the present invention includes therapy of ischemic tissues or prevention of ischemic obstruction, specifically, for example, prevention of necrosis in ischemic tissues, sustaining ischemic tissues, promotion of angiogenesis in ischemic tissues, tissue regeneration, and preventing and decreasing obstruction caused by ischemia.

The present invention provides methods for inducing angiogenesis, which comprises the step of administering Paramyxovirus vectors encoding angiogenic genes. Moreover, the present invention provides methods for treating ischemic tissues, which comprises the step of administering Paramyxovirus vector

encoding angiogenic gene. There is no limitation to the target individuals and, for example, a desirable mammal including a human can be used. In particular, non-human mammals, such as primates including monkeys such as prosimian, platyrhine monkeys, and catarrhine monkeys, apes of anthropoid, rodents such as mice, rats, and guinea pigs, as well as cows, dogs, cats, horses, sheep, and rabbits can be targets for administration. It is possible to treat ischemia in the animals using vectors of the present invention and also possible to use the animals as ischemia therapy models for humans (Morinaga, K. et al., 1987, J. Vasc. Surg. 5: 719-730; Itoh, H. et al., 1994, Atherosclerosis 110: 259-270).

Specific methods for inducing angiogenesis according to the present invention include the following methods: a] a method for inducing angiogenesis, which comprises the step of administering a Paramyxovirus vector encoding an angiogenic gene or a cell containing the vector; [b] the method of [a], in which the angiogenic gene is fibroblast growth factor 2 (FGF2); [c] the method of [a] or [b], in which the gene is administered intramuscularly ; and [d] the method of any one of [a] to [c], in which the Paramyxovirus is Sendai virus.

Examples of the methods for treating the ischemic tissues in the present invention include the following methods:

[a] a method for treating the ischemic tissues, which comprises the step of administering a Paramyxovirus vector encoding an angiogenic gene or a cell containing the vector; [b] the method of [a], in which the angiogenic gene is fibroblast growth factor 2 (FGF2); [c] the method of [a] or [b], in which the gene is administered intramuscularly; and [d] the method of any one of [a] to [c], in which the Paramyxovirus is Sendai virus.

Administration can be carried out either *in vivo* or *ex vivo*. For *in vivo* administration, Paramyxovirus vectors encoding angiogenic genes can be injected via administration routes well known

to those skilled in the art such as intramuscular injection, subcutaneous injection, and catheter administration. For *ex vivo* administration, the vectors are used to pre-transfect cells *in vitro*. The cells containing the vectors are then injected *in vivo* by methods 5 such as intramuscular injection, subcutaneous injection, and catheter administration. The cells for transferring vectors in *ex vivo* administration can be either heterologous or homologous to the target individuals, but are preferably homologous thereto. Cells derived from the target individual are more preferable. Moreover, 10 the cells are most preferably derived from bone marrow or blood, including cells which can form vascular endothelial cells or which can be differentiated into vascular endothelial cells, that is, vascular endothelial progenitor cells. Angiogenesis can be induced in target tissues into which a pharmaceutically effective dose of 15 a vector of the present invention is administered. Therefore, it is possible to perform treatment for preventing tissue necrosis and limb amputation in, for example, ischemic brains, hearts, kidneys, lungs, and limbs.

Furthermore, the present invention provides Paramyxovirus 20 vectors encoding angiogenic genes to treat ischemic tissues. Specifically, the present invention provides:

- [a] a Paramyxovirus vector encoding an angiogenic gene for treating an ischemic tissue;
- [b] the vector of [a], in which the angiogenic gene is fibroblast 25 growth factor 2 (FGF2);
- [c] the vector of [a] or [b], in which the vector is used for intramuscular administration; and
- [d] the vector of any one of [a] to [c], in which Paramyxovirus is Sendai virus.

Moreover, the present invention provides compositions, 30 comprising Paramyxovirus vectors for treating ischemic tissues. The compositions can include pharmaceutically acceptable carriers in addition to Paramyxovirus vectors. For example, the vectors of the present invention can be formulated into injections with physiological solutions or into implants with solid or semisolid 35 (gel) materials.

Paramyxovirus vectors used for angiogenic gene transfer according to the present invention is not particularly limited. For instance, preferable Paramyxovirus vectors include vectors that are able to replicate and autonomously proliferate. In general, for 5 example, the genome of wild type Paramyxoviruses contain a short 3' leader region followed by six genes encoding nucleocapsid (N), phospho (P), matrix (M), fusion (F), hemagglutinin-neuraminidase (HN), and large (L) proteins, and has a short 5' trailer region on the other terminus. Vectors of the present invention that are able 10 to replicate autonomously can be obtained by designing a genome having a similar structure to that as described above. In addition, a vector for expressing an exogenous gene can be obtained by inserting an exogenous gene to the genome of the above vector. Paramyxovirus vectors of the invention may have an altered alignment of virus genes, 15 compared with wild type viruses.

Paramyxovirus vectors of the present invention may have any deletion of the genes that are contained in the wild-type Paramyxovirus. For instance, when Sendai virus vectors are reconstituted, proteins encoded by NP, P/C, and L genes are thought 20 to be required in trans, but the genes themselves may not be a component of virus vectors of the present invention. For example, an expression vector carrying genes encoding the proteins may be co-transfected into host cells with another expression vector encoding the vector genome to reconstitute a vector. Alternatively, 25 an expression vector encoding the virus genome is introduced into host cells carrying genes encoding the proteins, and then the vector can be reconstituted by using the proteins derived from the host cell. The amino acid sequence of these proteins may not be identical to those derived from the original virus as long as it has an equivalent 30 or higher activity in nucleic acid transfer, and may be mutated or replaced with that of a homologous gene of another virus.

Proteins encoded by M, F, and HN genes are thought to be essential for cell-to-cell propagation of a Paramyxovirus vector. However, these proteins are not required when a Paramyxovirus vector 35 is prepared as RNP. If genes M, F, and HN are components of the genome contained in RNP, products of these genes are produced when

introduced into host cells, and virus particles having infectivity are generated. RNP vectors that produce an infective virus include, for example, a viral genomic RNA encoding N, P, M, F, HN, and L genes and N, P, and L proteins. When such RNP is introduced into cells, 5 virus genome is expressed and replicated through functions of N, P, and L proteins, and thus infective virus vectors are amplified.

RNP can be introduced into cells as a complex with, for example, lipofectamine and polycationic liposome. Specifically, a variety of transfection reagents can be used, for instance, DOTMA 10 (Boehringer), Superfect (QIAGEN #301305), DOTAP, DOPE, and DOSPER (Boehringer #1811169). Chloroquine may be added to prevent degradation in the endosome (Calos M. P., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1983, 80, 3015). For replicative viruses, the produced viruses can be amplified or passaged by re-infecting into cultured cells, chicken 15 eggs, or animals (e.g. mammalian such as mice).

Paramyxovirus vectors lacking the M, F, and/or HN genes are also used preferably as Paramyxovirus vectors of the present invention. These virus vectors can be reconstituted by providing deleted gene products exogenously. Such vectors can still adhere to host cells 20 and induce cell fusion like the wild-type virus. However, daughter virus particles do not have the same infectivity as the parent ones because the vector genome introduced into cells lacks one or more of these genes. Therefore, these vectors can be useful as safe virus vectors that are capable of only a single gene transfer. 25 Specifically, genes deleted from the genome may be F and/or HN genes. "Gene-deficient" is defined as substantial loss of gene function, and, when a deficient gene encodes a protein, the gene-deficient mutant does not express any protein having a function equivalent to the wild type protein. For example, being deficient in one or more 30 genes can be achieved by no transcription of the gene(s), loss-of-function mutants, and deletion of the genes. Gene-deficient means that, preferably, at least a part of the coding region, more preferably, the entire coding region of the gene is deficient. For example, F gene-deficient vectors are vectors deficient in, 35 preferably, a part of the F protein-coding region, more preferably, the entire F protein-coding region. Still more preferably, F

gene-deficient vectors of the present invention lack the start signal sequence in the 3' flanking site of the F gene, which is deficient in the negative chain in the genome. Therefore, unnecessary polypeptides expression from the deficient area can be suppressed.

- 5 When the open reading frame (ORF) encoding unnecessary polypeptides exist in the deficient region, it is desirable to remove the ORF by methods such as site-directed mutagenesis (described later).

For preparing F gene-deficient vectors, virus vectors can be reconstituted by co-transfection of an expression plasmid encoding the genome of a recombinant Paramyxovirus lacking the F gene, with an expression vector for the F protein, and that for NP, P/C, and L proteins into host cells (International Publication numbers WO 00/70055 and WO 00/70070). Alternatively, host cells in which the F gene is integrated into the chromosome may be used. The amino acid sequence of these proteins provided exogenously may not be identical to those of the wild type and may be mutated or replaced by a homologous protein of another virus as long as they provide equivalent or higher gene transfer activity.

The envelope protein of Paramyxovirus vectors of the invention may contain another protein than the envelope protein of the original vector genome. There is no limitation on such proteins. These include envelope proteins of other viruses such as the G protein (VSV-G) of the vesicular stomatitis virus (VSV). Thus, Paramyxovirus vectors of the invention include a pseudo-type virus vector that has an envelope protein derived from a virus different from the original virus.

Paramyxoviral vectors of the present invention may also comprise, for example, on the viral envelop surface, proteins capable of adhering to particular cells, such as adhesion factors, ligands and receptors or chimeric proteins comprising a protein described above on the outer surface and viral envelop-derived polypeptides inside the virus. It enables the production of a vector targeting a particular tissue. These proteins may be encoded by the virus genome itself, or supplied at the time of virus reconstitution through expression of genes other than virus genome (for example,

genes derived from another expression vector or host cell chromosome).

The virus genes contained in the vector of the present invention may be altered, for example, to reduce antigenicity or enhance RNA transcription efficiency or replication efficiency. Specifically, it is possible to alter at least one of the NP, P/C, and L genes, which are genes of replication factors, to enhance transcription or replication. It is also possible to alter the HN protein, a structural protein having hemagglutinin activity and neuraminidase activity, to enhance the virus stability in blood by weakening the former activity and to regulate infectivity by altering the latter activity. It is also possible to alter the F protein, which is implicated in membrane fusion, to regulate its fusion ability. Furthermore, it is possible to analyze the antigen presenting epitopes and such of possible antigenic molecules on the cell surface such as the F protein and HN protein and use them to generate a Paramyxovirus vector that is engineered to have weak antigen presenting ability.

Paramyxovirus vectors of the present invention may also lack accessory genes. For example, the disruption of the V gene, one of the accessory genes of SeV, results in reduction of pathogenicity of SeV toward hosts such as mouse without affecting gene expression and replication in cultured cells (Kato, A. et al. 1997. J. Virol. 71:7266-7272; Kato, A. et al. 1997. EMBO J. 16:578-587; Curran, J. et al., WO 01/04272, EP 1067179). Such attenuated vectors are particularly suitable as *in vivo* or *ex vivo* gene transfer vectors.

Viral vectors of the present invention encode angiogenic genes in its genomic RNA. Recombinant Paramyxovirus vector comprising exogenous genes can be prepared by inserting exogenous genes into the above-mentioned Paramyxovirus vector genome. An exogenous gene can be a desired angiogenic gene to be expressed in target tissues, such as ischemic tissues, for vector transfer. The exogenous gene may encode a naturally occurring protein, or a modified protein prepared by modifying the original protein by deletion, substitution, or insertion, as long as the modified protein is functionally equivalent to the naturally occurring protein. For instance, for

the purpose of gene therapy and such, a gene used to treat a target disease may be inserted into the DNA (virus vector DNA) encoding the genome of the virus vector. In the case of inserting an exogenous gene into virus vector DNA, such as Sendai virus vector DNA, a sequence comprising nucleotides of multiples of six is desirably inserted between the transcription end sequence (E) and the transcription start sequence (S) (Calain P. and Roux L., J. Virol., 1993, 67(8), 4822-4830). An exogenous gene can be inserted upstream and/or downstream of each of the virus genes (NP, P, M, F, HN, and L genes). In order not to interfere with the expression of upstream and downstream genes, an E-I-S sequence (transcription end sequence-intervening sequence-transcription start sequence) or a portion of it may be suitably placed upstream or downstream of an exogenous gene so that E-I-S sequence is located between each gene.

Alternatively, an exogenous gene can be inserted via IRES sequence.

Expression level of inserted exogenous genes can be regulated by the type of transcription start sequence that is attached to the upstream of the genes (WO 01/18223). It also can be regulated by the position of insertion and the sequence surrounding the gene. In the Sendai virus, for instance, the closer to the 3'-terminus of the negative strand RNA of the virus genome (the closer to NP gene in the gene arrangement on the wild type virus genome) the insertion position is, the higher the expression level of the inserted gene will be. To achieve a high expression of an exogenous gene, it is preferably inserted into the upstream region of the negative stranded genome such as the upstream of the NP gene (3' flanking sequence on the negative strand), or between NP and P genes. Conversely, the closer to the 5'-terminus of the negative strand RNA (the closer to L gene in the gene arrangement on the wild type virus genome) the insertion position is, the lower the expression level of the inserted gene will be. To reduce the expression of an exogenous gene, it may be inserted into the most 5' position on the negative strand, that is, downstream of the L gene in the wild type virus genome (5' flanking region of the L gene on the negative strand) or upstream of the L gene (3' flanking region of L gene on the negative strand). Thus, the insertion position of an exogenous gene can be properly adjusted

to obtain a desired expression level of the gene or optimize the combination of the insert with the virus genes surrounding it. For instance, if the overexpression of an angiogenic gene introduced by a high-titer virus vector may cause toxicity, it is possible not only 5 to control the titer of viruses to be administered but also to reduce the expression level of individual virus vectors by designing the insertion position of the angiogenic gene closer to the 5'-terminus of the negative strand, or replacing the transcription start sequence with one having lower efficiency so as to obtain an appropriate 10 effect.

To help the easy insertion of an exogenous gene, a cloning site may be designed at the position of insertion. For example, the cloning site may be the recognition sequence of restriction enzymes. The restriction sites in the vector DNA encoding viral genome can 15 be used to insert an exogenous gene. The cloning site may be a multicloning site that contains recognition sequences for multiple restriction enzymes. The vector of the present invention may have other exogenous genes at positions other than that used for above insertion. Such exogenous gene may be, without limitation, an 20 angiogenic gene or another gene.

Construction of a recombinant Sendai virus vector having an exogenous gene can be performed as follows, for example, according to the method described in Hasan, M. K. et al., J. Gen. Virol., 1997, 78: 2813-2820, Kato A. et al., EMBO J., 1997, 16: 578-587, and Yu 25 D. et al., Genes Cells, 1997, 2: 457-466.

First, a DNA sample containing a cDNA nucleotide sequence encoding a desired exogenous gene is prepared. It is preferable that the concentration of the DNA sample is 25 ng/ $\mu$ l or higher and that it can be detected as a single plasmid by electrophoresis. The 30 following description is an example where an exogenous gene is inserted into the NotI site of virus genomic DNA. If the target cDNA sequence contains a NotI recognition site, the site is desirably removed in advance by altering the nucleotide sequence using the known method such as site-directed mutagenesis while maintaining the 35 encoded amino acid sequence. A desired DNA fragment is amplified by PCR from the DNA sample. In order to obtain a fragment having

NotI sites at both ends and to add a single copy of the transcription end sequence (E), intervening sequence (I), and transcription start sequence (S) of the Sendai virus (EIS sequence) to one end, synthesized DNA sequences (primer pair), namely, a pair of a forward 5 primer (sense strand) comprising a part of the desired gene, and a reverse primer (antisense) comprising a NotI recognition site, E, I, and S sequences, and part of the desired gene, is prepared.

For example, the forward synthetic DNA sequence contains two or more nucleotides at the 5'-terminus to ensure digestion with NotI 10 (preferably 4 nucleotides not containing a sequence derived from the NotI recognition site, such as GCG and GCC; more preferably ACTT). To the 3'-terminus of the sequence, the NotI recognition sequence GCGGCCGC is added. Furthermore, to the 3'-terminus, as a spacer, any 9 nucleotides or those of 9 plus multiples of 6 are added. 15 Furthermore, to the 3'-terminus, a sequence of approximately 25 nucleotides corresponding to the ORF of the desired cDNA starting from the initiation codon ATG is added. The 3'-terminus of the forward synthetic oligo DNA containing approximately 25 nucleotides of the desired cDNA is preferably selected so that the last nucleotide 20 is G or C.

The reverse synthetic DNA sequence contains two or more nucleotides at the 5'-terminus (preferably 4 nucleotides not containing a sequence derived from the NotI recognition site, such as GCG and GCC; more preferably ACTT). To the 3'-terminus of the 25 sequence, the NotI recognition sequence GCGGCCGC is added. Furthermore, to the 3'-terminus, a spacer oligo DNA is added to adjust the length of the primer. The length of the oligo DNA is designed so that it is a multiple of 6 nucleotides including the NotI recognition sequence GCGGCCGC, the sequence complementary to the 30 cDNA, and the EIS sequence derived from the Sendai virus genome as described below (so-called "rule of six"; Kolakofski D. et al., J. Virol., 1998, 72, 891-899; Calain P. and Roux L., J. Virol., 1993, 67, 4822-4830). Furthermore, to the 3'-terminus of the added 35 sequence, complementary sequences to the S sequence of the Sendai virus, preferably 5'-CTTCACCCCT-3' (SEQ ID NO: 1), to the I sequence, preferably 5'-AAG-3', and to the E sequence, preferably

5'-TTTTTCTTACTACGG-3' (SEQ ID NO: 2) are added. Finally, to the 3'-terminus, a sequence, which is selected so that the last nucleotide of the complementary sequence of the desired cDNA becomes G or C, is added, where the last nucleotide is approximately 25 5 nucleotides upstream from the termination codon. Thus, the 3'-terminus of the reverse synthetic oligo DNA is prepared.

PCR can be performed by a common method using, for example, ExTaq polymerase (TaKaRa). Vent polymerase (NEB) may be used preferably, and the amplified fragment is digested with NotI, and inserted into 10 the NotI site of the plasmid vector pBluescript. The nucleotide sequence of the obtained PCR product is checked with an automated DNA sequencer, and a plasmid having the correct sequence is selected. The insert is excised from the plasmid by NotI digestion, and subcloned into the NotI site of the plasmid comprising Paramyxovirus 15 genomic cDNA. Alternatively, the PCR products may be directly cloned into the NotI site without using pBluescript plasmid vector to obtain recombinant Sendai virus cDNA.

For example, recombinant Sendai virus genomic cDNA can be constructed according to the methods described in literatures (Kato, 20 A. et al., EMBO J. 16: 578-598, 1997; Hasan, M. K. et al., J. Gen. Virol., 78: 2813-2820, 1997; Yu, D. et al., Genes Cells, 1997, 2, 457-466; and Li, H. O. et al., J. Virology 74, 6564-6569, 2000). For example, a 18-bp spacer sequence containing the NotI site (5'-(G)-CGGCCGCAGATCTTCACG-3'; SEQ ID NO: 3) is inserted into an 25 adjacent gene locus of a cloned Sendai virus genomic cDNA (pSeV(+)) between the leader sequence and the 5'-terminus of a sequence encoding the N protein, and the plasmid pSeV18<sup>b</sup>(+) containing a self-cleavable ribozyme site derived from the antigenomic strand of the hepatitis delta virus is obtained (Hasan M. K. et al., J. General 30 Virol., 1997, 78, 2813-2820). An exogenous gene fragment is inserted into the NotI site of pSeV18<sup>b</sup>(+) to obtain a recombinant Sendai virus cDNA into which a desired exogenous gene has been inserted.

The recombinant Paramyxovirus vector prepared as described above is transcribed *in vitro* or intracellularly, and RNP is 35 reconstituted in the presence of viral L, P, and NP proteins to produce a viral vector comprising the RNP. The present invention

provides a method for producing a Paramyxovirus vector encoding an angiogenic gene, the method comprising the steps of transcribing DNA encoding the Paramyxovirus vector genome intracellularly, in the presence of proteins that allow for transcription and replication of the genome, and recovering Paramyxovirus vector products. The proteins that allow for transcription and replication of Paramyxovirus vector genome include, for example, N, L, and P proteins. The present invention also provides DNA for producing a Paramyxovirus vector of the present invention, wherein said DNA 5 comprises the above-mentioned DNA. The present invention also relates to the use of DNA encoding the vector genome, for producing Paramyxovirus vectors of the present invention. Reconstitution of a virus from virus vector DNA can be performed according to the known methods (WO 97/16539; WO 97/16538; Durbin A. P. et al., Virol., 1997, 10 235, 323-332; Whelan S. P. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1995, 92, 8388-8392; Schnell M. J. et al., EMBO J., 1994, 13, 4195-4203; Radecke F. et al., EMBO J., 1995, 14, 5773-5784; Lawson N. D. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1995, 92, 4477-4481; Garcin D. et al., EMBO J., 1995, 14, 6087-6094; Kato A. et al., Genes Cells, 1996, 1, 15 569-579; Baron M. D. and Barrett T., J. Virology, 1997, 71, 1265-1271; Bridgen A. and Elliott R. M., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1996, 93, 15400-15404). These methods enable the reconstitution of desirable Paramyxovirus vectors including the parainfluenza virus, vesicular stomatitis virus, rabies virus, measles virus, rinderpest virus, and 20 Sendai virus vectors from DNA. If the F, HN, and/or M genes are deleted from the virus vector DNA, infective virus particles will not be formed. However, it is possible to generate infective virus particles by introducing these deleted genes and/or genes encoding an envelope protein from another virus into the host cells and 25 expressing them.

Methods for introducing vector DNA into cells may include (1) a method for forming DNA precipitates that can be incorporated into desired cells, (2) a method for making a complex that comprises positively charged DNA, that is suitable for being incorporated into 30 desired cells and that has low cytotoxicity, and (3) a method for

instantaneously opening a pore large enough for DNA to pass through in the desired plasma membrane using an electrical pulse.

A variety of transfection reagents can be used in (2), for instance, including DOTMA (Boehringer), Superfect (QIAGEN #301305), 5 DOTAP, DOPE, and DOSPER (Boehringer #1811169). For (1), transfection using calcium phosphate can be used. In this method, DNA incorporated by cells is taken up into phagocytic vesicles, but it is known that a sufficient amount of DNA is also taken up into the nucleus (Graham F. L. and van Der Eb J., Virology, 1973, 52, 456; Wigler M. and 10 Silverstein S., Cell, 1977, 11, 223). Chen and Okayama studied the optimization of the transfer technology and reported (1) that maximal efficiency is obtained when cells and precipitates are incubated under 2% to 4% CO<sub>2</sub> at 35°C for 15 hr to 24 hr, (2) that circular DNA has higher activity than linear DNA, and (3) that the optimal 15 precipitates are formed when the DNA concentration in the mixed solution is 20 µg/ml to 30 µg/ml (Chen C. and Okayama H., Mol. Cell. Biol., 1987, 7, 2745). The method of (2) is suitable for transient transfection. More classically, a transfection method in which DEAE-dextran (Sigma #D-9885 M. W. 5x 10<sup>5</sup>) is mixed with DNA at a 20 desired concentration ratio is known. Because most complexes are degraded in the endosome, chloroquine may be added to enhance the transfection efficiency (Calos M. P., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1983, 80, 3015). The method of (3), called electroporation, may be more broadly applied than the methods of (1) and (2) because it can 25 be used for any kind of cells. The transfection efficiency can be maximized by optimizing the duration of pulse currents, the form of pulse, the strength of the electrical field (gap between electrodes, and voltage), conductivity of buffer, DNA concentration, and cell density.

30 In the present invention, transfection reagents are suitably used because, among the above three methods, the method of (2) is easy to perform and enables the testing of a large number of samples using a large amount of cells. Preferable transfection reagents include, the Superfect Transfection Reagent (QIAGEN, Cat No. 301305) 35 and the DOSPER Liposomal Transfection Reagent (Boehringer Mannheim, Cat No. 1811169), but are not limited thereto.

Specifically, the reconstitution from cDNA is performed as follows.

LLC-MK2, a cell line derived from a monkey kidney, is cultured in a 24-well to 6-well plastic plate or in a 100-mm petri dish in minimum essential medium (MEM) containing 10% fetal calf serum (FCS) and an antibiotic (100 units/ml penicillin G and 100 µg/ml streptomycin) to be 70% to 80% confluent. Cells are then infected, for instance, at 2 pfu/cell with recombinant vaccinia virus vTF7-3 that expresses T7 polymerase, which has been inactivated by a 20-minute UV exposure in the presence of 1 µg/ml psoralen (Fuerst T. R. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1986, 83, 8122-8126; and Kato. A. et al., Genes Cells, 1996, 1, 569-579). The amount of psoralen and the duration of UV exposure can be optimized. One hour after infection, cells are transfected by, for example, lipofection using Superfect (QIAGEN) with 2 µg to 60 µg of, or more preferably 3 µg to 5 µg of the above recombinant Sendai virus cDNA together with expression plasmids for virus proteins (24-0.5 µg pGEM-N, 12-0.25 µg pGEM-P, and 24-0.5 µg pGEM-L, or more preferably 1 µg pGEM-N, 0.5 µg pGEM-P, and 1 µg pGEM-L) (Kato. A. et al., Genes Cells, 1996, 1, 569-579) that function in trans and are required for producing a full-length Sendai virus genome. The transfected cells are cultured in serum-free MEM containing, if desired, 100 µg/ml rifampicin (Sigma) and cytosine arabinoside (AraC) (Sigma), more preferably 40 µg/ml arabinoside alone, so that the drug concentration is adjusted to be optimal to minimize the cytotoxicity of the vaccinia virus and maximize the recovery of virus (Kato. A. et al., Genes Cells, 1996, 1, 569-579). Cells are cultured for 48 hr to 72 hr after transfection, then collected and lysed through three cycles of freeze-thawing. The cell lysates are transfected into LLC-MK2 cells, and after a 3-day to 7-day culture, the culture medium is collected. To reconstitute a virus vector lacking a gene encoding an envelope protein that is incapable of replication, the vector may be transfected into LLC-MK2 cells expressing an envelope protein, or co-transfected with expression plasmid for the envelope protein. Alternatively, transfected cells can be overlaid and cultured on LLC-MK2 cells expressing envelope protein to propagate a deletion virus vector (see

International Publication Numbers WO 00/70055 and WO 00/70070). The virus titer of the culture medium can be determined by measuring hemagglutinin activity (HA). The HA may be determined by "endo-point dilution" (Kato. A. et al., Genes Cells, 1996, 1, 569-579; Yonemitsu Y. and Kaneda Y., Hemagglutinating virus of Japan-liposome-mediated gene delivery to vascular cells., Molecular Biology of Vascular Diseases. Methods in Molecular Medicine, Ed. by Baker A. H., Humana Press, 1999, 295-306). To eliminate the possible contamination of vaccinia virus vTF7-3, the obtained allantoic fluid sample may be diluted appropriately ( $10^6$  times for instance) and re-amplified in chicken eggs. Re-amplification may be repeated, for example, three times or more. The obtained virus stock can be stored at -80°C.

Host cells for viral reconstitution are not limited to any special types of cells as long as the virus vector can be reconstituted in the cells. Host cells may include monkey kidney-derived cells such as LLC-MK2 cells and CV-1 cells, cultured cell lines such as BHK cells derived from a hamster kidney, and human-derived cells. Furthermore, to obtain a large quantity of the Sendai virus vector, embryonated chicken eggs may be infected with virus vectors obtained from the above host cells and the vectors can be amplified. The method of producing virus vectors using chicken eggs has been established (Advanced protocols in neuroscience study III, Molecular physiology in neuroscience., Ed. by Nakanishi et al., Kouseisha, Osaka, 1993, 153-172). Specifically, for example, fertilized eggs are incubated for 9 days to 12 days at 37°C to 38°C in an incubator to grow the embryos. Virus vectors are inoculated into the allantoic cavity, and eggs are further incubated for several days to propagate the vectors. Conditions such as the duration of incubation may vary depending on the type of recombinant Sendai virus used. Then, the allantoic fluids containing viruses are recovered. Sendai virus vector is separated and purified from the allantoic fluid sample according to the standard method (Tashiro M., Protocols in virus experiments., Ed. by Nagai and Ishihama, MEDICAL VIEW, 1995, 68-73). Moreover, trypsin resistant cells (for example, cells such as LLC-MK2) are preferred for the mass production of F gene-deficient Sendai virus.

The construction and the preparation of Sendai virus vectors deficient in F gene can be performed, for example, as follows (see WO00/70055 and WO00/70070).

5 1. Construction of cDNA encoding F gene-deficient Sendai virus genome for cloning endogenous genes.

Full-length Sendai virus (SeV) genomic cDNA, pSeV18<sup>+</sup>b(+) (Hasan, M. K. et al., J. Gen. Virol. 78, 2813-2820, 1997) ("pSeV18<sup>+</sup>b(+)" is also referred to as "pSeV18<sup>+</sup>"), is digested with 10 SphI/KpnI and the digested fragment (14673 bp) is recovered. The fragment is subcloned into pUC18 to obtain the plasmid pUC18/KS. Construction of F gene-deficient region is performed using pUC18/KS with a combination of PCR and ligation techniques. F gene-deficient SeV genomic cDNA (pSeV18<sup>+</sup>/ΔF) is constructed by removing the F gene 15 ORF (ATG-TGA= 1698 bp) and filling in the gap with atgcatgccggcagatga (SEQ ID NO: 4). In PCR, primer pairs consisting of forward: 5'-gtttagtactgcaagagc (SEQ ID NO: 5) and reverse: 5'-tttgcggcatgcattttccaaaggggagatggcaacc (SEQ ID NO: 6) are used in the upstream of F gene, and primer pairs consisting of forward: 20 5'-atgcattgcggcagatga (SEQ ID NO: 7) and reverse: 5'-tgggtaatgagagaatcagc (SEQ ID NO: 8) are used in the downstream of F gene. The PCR products are then ligated to the EcoT22I site. The thus-obtained plasmid is digested with SacI and SalI and the fragment 25 (4931 bp) which contains the F gene-deficient region is subcloned into pUC18 to give pUC18/dFSS. This pUC18/dFSS is digested with DraIII and the digested fragment is recovered. The fragment is replaced with a F gene-containing DraIII fragment of pSeV18<sup>+</sup> to construct plasmid pSeV18<sup>+</sup>/ΔF.

30 The EIS sequence (SeV specific sequence, E, end; I, intergenic; S, start) of the F gene remains in the construct and the construct may express polypeptides consisting of 5 amino acids derived from the primer used to connect the gap even though the downstream ORF of the F gene is removed.

35 The insertion of exogenous genes into the F gene-deficient region can be achieved using NsiI and NgoMIV restriction enzyme sites that are located at the F gene-deficient region in pUC18/dFSS. In

order to clone exogenous genes into the region, for example, exogenous gene fragments can be amplified using an NsiI-tailed primer and an NgoMIV-tailed primer.

For example, EGFP gene is amplified first by PCR to construct 5 a cDNA containing the EGFP gene (pSeV18<sup>+</sup>/ΔF-GFP). In order to adjust the number of nucleotides of the EGFP gene fragment to contain a multiple of 6 (Hausmann, S. et al., RNA 2, 1033-1045, 1996), PCR is performed using NsiI-tailed primer (5'-atgcatatggatgcgggtttggcagttac /SEQ ID NO: 9) as the 5' end primer 10 and NgoMIV-tailed primer (5'-tgccggctattattacttgcacagctcg /SEQ ID NO: 10) as the 3' end primer. The PCR product is digested with restriction enzymes NsiI and NgoMIV and the fragment is recovered from a gel. The fragment is subcloned into the F gene-deficient region in pUC18/dFSS using NsiI and NgoMIV restriction enzyme sites 15 and the sequence is confirmed. The DraIII fragment containing the EGFP gene is then recovered, replaced with the F gene-containing DraIII fragment of pSeV18<sup>+</sup>, and ligated to obtain pSeV18<sup>+</sup>/ΔF-GFP.

The insertion of exogenous genes into the upstream of the NP gene is achieved using the restriction enzyme NotI recognition site 20 located in pSeV18<sup>+</sup>/ΔF or pSeV18<sup>+</sup>/ΔF-GFP. However, pSeV18<sup>+</sup>/ΔF has a sequence that may express a 5-amino acid peptide derived from the primer used to connect to the F gene-deficient region. Moreover, GFP is co-expressed by pSeV18<sup>+</sup>/ΔF-GFP. Therefore, the gene constructs are prepared as follows so that the peptides or GFP are 25 not expressed, if it is necessary.

The fragment (6288 bp) which contains the F gene-deficient region is recovered by digesting pSeV18<sup>+</sup>/ΔF-GFP with SalI and NheI and subcloned into Litmus 38 (New England Biolabs, Beverly, MA) to obtain LitmusSalINheIfrg/ΔF-GFP. Deletion of the EGFP gene 30 containing the EIS sequence upstream of the F gene, which has been deleted, is conducted by the inverse PCR method. PCR is performed using a reverse primer (5'-gttaccagggtggagagtttgcaaccaaggcac /SEQ ID NO: 11) which is designed to contain the restriction enzyme SexAI recognition sequence upstream of the GFP gene and a forward primer 35 (5'-cttcacacctggataacaaggcacagatcatggatgg /SEQ ID NO: 12) which is designed to contain the restriction enzyme SexAI recognition

sequence downstream of the GFP gene. The preferable sized fragment (10855 bp) is excised and ligated to delete the EGFP gene containing the EIS sequence upstream of the F gene, which has been deleted.

The resulting construct has an extra 15-bp sequence between the 5 two SexAI sites due to the primer design. Therefore, the plasmid is used to transform *E. coli* SCS110 strain (*dcm*<sup>-</sup>/*dam*<sup>-</sup> SCS110 strain is used because SexAI is methylated and cannot be digested with it). The plasmid is digested with restriction enzyme SexAI and two gene fragments, 1628 bp and 9219 bp, are recovered and ligated to remove 10 the extra 15-bp fragment contained in LitmusSalINheIfrg/ΔF (Δ5aa), in which the EGFP gene containing the EIS sequence upstream of the F gene and having the multiple of 6 numbers of nucleotides is deleted. The plasmid is digested with SalI and NheI and the fragment is recovered, replaced with SalI/NheI fragment, which contains the F 15 gene from pSeV18<sup>+</sup>, and ligated to obtain plasmid pSeV18<sup>+</sup>/ΔF (Δ5aa).

Insertion of an exogenous gene into the plasmid is performed, for example, using the recognition sequence of restriction enzyme NotI located upstream of the NP gene.

20 2. Construction of cDNA encoding F gene-deficient Sendai virus genome containing hFGF2 gene

Various methods are known for obtaining human FGF2 (hFGF2) cDNA. For example, RT-PCR is performed to isolate cDNA using vascular smooth muscle cells obtained from the human great saphenous vein with 25 a patient's consent. The hFGF2 cDNA is then prepared by subcloning the amplified product into pBluescriptSK+ (Stratagene, La Jolla, CA) at HindIII (5' end) and EcoRI (3' end). The hFGF2 cDNA sequence can be confirmed by comparing with that in the report by Abraham et al. (Abraham, J. A. et al., EMBO J. 5 (10), 2523-2528, 1986).

30 In order to insert the hFGF2 gene at the restriction enzyme NotI site located upstream of the NP gene, the hFGF2 gene fragment can contain the SeV specific sequence (EIS sequence) at its 3' end, and NotI recognition sequences at its both ends. Specifically, PCR is performed using the hFGF2 cDNA as a template and N-terminus primer 35 (5' -

atccgcggccgccaaagttcacttatggcagccggagcatcaccacgctgcccgcctgccccg

aggatggcggcagcggcgcc /SEQ ID NO: 13) containing a start codon and C-terminus primer (5'-  
atccgcggccgcgatgaactttcacccataagtttcttactacggtagcttttagcagacat  
tggaaagaaaaagtatagc /SEQ ID NO: 14) containing a stop codon region  
5 and the EIS sequence. The amplified fragment is digested with NotI and then subcloned into pBluescriptSK+ (Stratagene, La Jolla, CA) to obtain pBS-hFGF2. The nucleotide sequence is confirmed and, in case the gene contains mutations, mutations are corrected using, for example, QuickChange™ Site-directed Mutagenesis Kit (Stratagene, La  
10 Jolla, CA) according to the attached protocol. The fragment containing hFGF2 cDNA is obtained by digesting pBS-hFGF2 with NotI and inserted into pSeV18<sup>+</sup>/ΔF (Δ5aa) at the NotI site located upstream of the NP gene to construct F gene-deficient Sendai virus genomic cDNA containing hFGF2 gene, pSeV18<sup>+</sup> hFGF2/ΔF (Δ5aa). Hereafter,  
15 pSeV18<sup>+</sup>hFGF2/ΔF (Δ5aa) is also indicated as pSeV18<sup>+</sup>hFGF2/ΔF.

### 3. Construction of F expression plasmid

Plasmid pCALNdLw (*Cre/loxP* inducible expression plasmid; Arai, T. et al., J. Virol. 72 (2), 1115-1121, 1998), which is designed to induce the expression of gene products by *Cre* DNA recombinase, can be used to express the Sendai virus F gene (SeV-F). The fragment (1783 bp) containing the SeV-F gene is isolated by digesting pUC18/KS with StyI and BstUI, blunt ended, and inserted into pCALNdLw at a unique SwaI site to construct the F expression plasmid pCALNdLw/F.  
25

### 4. Preparation of helper cell line, which inducibly expresses SeV-F protein

A helper cell line, which expresses SeV-F protein, is established to recover infectious virus particles from the F gene-deficient genome. For example, cells can be obtained from LLC-MK2 cells, monkey kidney-derived cell line, which is often used for SeV propagation. LLC-MK2 cells are cultured in MEM containing 10% heat inactivated fetal bovine serum (FBS), 50 U/ml Sodium Penicillin G and 50 µg/ml Streptomycin in an atmosphere containing 5% CO<sub>2</sub> at 37°C. The plasmid, pCALNdLw/F, which is designed to induce the expression of the F gene product by *Cre* DNA recombinase, is  
30  
35

transferred into LLC-MK2 cells using the Calcium Phosphate method with Mammalian Transfection Kit (Stratagene, La Jolla, CA) according to protocols known to those skilled in the art.

Specifically, 10 µg of plasmid pCALNdLw/F is transferred into  
5 LLC-MK2 cells which are propagated to 40% confluence in a 10-cm dish  
and then the cells are cultured in 10ml MEM medium containing 10%  
FBS in an incubator with an atmosphere of 5% CO<sub>2</sub> at 37°C for 24 hours.  
Cells are scraped from the dish after 24 hours, suspended in 10 ml  
medium, and aliquoted to five 10-ml dishes so that, for example, 1  
10 dish contains 5 ml, 2 dishes contain 2 ml, and 2 dishes contain 0.2  
ml of cell suspension. Each cell is cultured in 10 ml MEM medium  
containing 1,200 µg/ml G418 (Gibco-BRL, Rockville, MD) and 10% FBS  
for 14 days with a medium change every 2 days and stably-transfected  
15 cell lines are selected. For example, 30 strains of G418 resistant  
cells, grown in the medium, are recovered using a cloning ring. Each  
clone is propagated until it becomes confluent in a 10-cm dish.

Selection of stably-transfected cell lines with F gene is  
carried out as follows. Specifically, the expression level of F  
protein can be analyzed semi-quantitatively by Western blotting. The  
20 cells are cultured to confluence in 6-cm dishes and then infected  
with Adenovirus AxCANCre at moi= 3 by the method by Saito et al. (Saito  
et al., Nucl. Acids Res. 23, 3816-3821, 1995; Arai, T. et al., J.  
Virol. 72 (2), 1115-1121, 1998) to induce expression of F protein  
in each clone. Three days after infection, the culture medium was  
25 removed from the dish, and then cells were washed twice with PBS  
buffer, scraped with a scraper, centrifuged at 1500 x g for 5 min,  
and collected. The cells are stored at -80°C and resuspended in 150  
µl PBS buffer after thawing. An equal amount of 2x Tris-SDS-BME sample  
loading buffer (0.625 M Tris (pH 6.8), 5% SDS, 25% 2-ME, 50% glycerol,  
30 and 0.025% BPB, Owl Separation Systems) is added thereto. The mixture  
is heat-treated at 98°C for 3 min and then subjected to  
electrophoresis. The samples (1x 10<sup>5</sup> cells per lane) are then  
subjected to SDS-polyacrylamide gel electrophoresis followed by  
Western blotting according to known protocols. SeV-F expression  
35 level is semi-quantitatively measured by Western blotting using

1:1000 dilution of anti-SeV-F antibody (f236) as the primary antibody.

By the method as described above, the establishment of LLC-MK2 cells in which SeV-F gene product can be inducibly expressed, is confirmed. Hereafter, these cells before the induction of SeV-F gene expression are described as LLC-MK2/F and the cells after the induction are described as LLC-MK2/F/Ad.

5        5. Reconstitution and amplification of F gene-deficient SeV

10        F gene-deficient Sendai virus genomic cDNA containing angiogenic gene(s) can be reconstituted by transfecting helper cells expressing F gene with it. For example, F gene-deficient Sendai virus genomic cDNA containing the hFGF2 gene (pSeV18<sup>+</sup>hFGF2/ΔF) as described above is used to transfect LLC-MK2 cells as follows. LLC-MK2 cells  
15        are seeded onto 10-cm petri dishes at a density of 5x 10<sup>6</sup> cells/dish, incubated for 24 hours, and transfected (at moi= 2 to 3, preferably 2) for 1 hour at room temperature with recombinant Vaccinia virus expressing T7 RNA polymerase (Fuerst, T. R. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83, 8122-8126, 1986) which has been treated with long wave  
20        UV (365 nm) and Solaren for 20 min. For UV exposure of the Vaccinia virus, for example, UV Stratalinker 2400 (Catalog No. 400676 (100 V), Stratagene, La Jolla, CA, USA) which is equipped with five 15-watt bulbs is used. Cells are washed twice and the plasmids pSeV18<sup>+</sup>hFGF2/ΔF, pGEM/NP, pGEM/P, pGEM/L (Kato, A., et al., Genes Cells 1, 569-579, 1996), and pGEM/F-HN (WO 00/70070) are resuspended  
25        in OptiMEM (GIBCO) at ratios of 12 µg, 4 µg, 2 µg, 4 µg, and 4 µg/dish, respectively, and mixed with SuperFect transfection reagent (1 µg DNA / 5 µl of Superfect, QIAGEN). Mixtures are left standing at room temperature for 15 min and then added to 3 ml OptiMEM containing 3%  
30        FBS. The resulting mixture is added to the cells and incubated for 3 to 5 hours. Cells are then washed twice with serum-free MEM and incubated in serum-free MEM containing 40 µg/ml of cytosine β-D-Arabinofuranoside (AraC, Sigma) and 7.5 µg/ml trypsin (GIBCO) for 24 hours.

35        The culture medium is removed from the cell culture and helper cell expressing F gene, LLC-MK2/F/Ad cells, which have been

constructed as described above, are layered on the cells. Specifically, LLC-MK2/F/Ad cells are resuspended in serum-free MEM (containing 40 µg/ml AraC and 7.5 µg/ml trypsin), layered on the cells without culture medium, and then incubated for 48 hours. Cells are 5 collected using a scraper and pellets are resuspended in OptiMEM (10<sup>7</sup> cells/ml) and freeze-thawed three times. The lysates are added (200 µl/well) to the LLC-MK2/F/Ad cells (4x 10<sup>6</sup> cells/ well in 12-well-plate) and additional 300 µl/well of serum-free MEM (containing 40 µg/ml AraC, 7.5 µg/ml trypsin) is added to each well 10 and then incubated for 15 hours to 24 hours. The culture medium is removed, and cells are washed with serum-free MEM, and replaced with fresh serum-free MEM (containing 40 µg/ml AraC and 7.5 µg/ml trypsin). Cells are incubated for 5 days to 9 days and the culture medium is collected. The collected medium contains reconstituted F 15 gene-deficient SeV particles. The F gene-deficient SeV particles can be amplified by infecting into LLC-MK2/F/Ad cells and culturing (or repeating the process) the cells in serum-free MEM (containing 40 µg/ml AraC and 7.5 µg/ml trypsin).

At this time, contamination of the recombinant Vaccinia virus 20 which is used to express T7 RNA polymerase during reconstitution, is mostly prevented by filtering the culture medium containing F gene-deficient SeV particles twice with a 0.22 µm filter. Specifically, the culture (post-P2 samples) amplified twice or more in serum-free MEM containing AraC (containing 40 µg/ml AraC and 7.5 25 µg/ml trypsin) are filtered twice with 0.22 µm filter and the culture is further amplified once in serum-free MEM containing AraC (containing 40 µg/ml AraC and 7.5 µg/ml trypsin) to obtain amplified F gene-deficient SeV which can serve as SeV free from recombinant Vaccinia virus contamination.

30 In preparing deletion virus vectors, two different virus vectors having deletion of a different envelope gene in the genome may be transfected into the same cell. In this case, each deleted envelope protein is supplied through expression from the other vector, and this mutual complementation permits the generation of 35 infective virus particles, which can replicate and propagate. Thus, two or more of the virus vectors of the present invention may be

simultaneously inoculated in a combination that complement each other, thereby producing a mixture of each envelope deletion virus vector at a low cost and in a large scale. Because these viruses lacking an envelope gene have a smaller genome, they can allow the 5 insertion of a long exogenous gene. In addition, it is difficult for these viruses, which are intrinsically non-infective, to keep the status of co-infection after being diluted outside cells, and thus they are sterilized and less harmful to the environment.

Once a viral vector is prepared using, as the exogenous gene, 10 a gene for the treatment of a disease, then the vector can be administered to perform gene therapy. When the viral vector of the present invention is used in gene therapy, an exogenous gene that ensures desired therapeutic effects or an endogenous gene whose expression is impaired in the body of a patient can be expressed 15 either by a method of direct administration or by a method of indirect (ex vivo) administration for gene expression. There is no limitation on the type of exogenous gene as long as it is an angiogenic gene or promotes angiogenesis, including not only a nucleic acid encoding a protein but also a nucleic acid encoding no protein, for example, 20 ribozyme or antisense nucleic acid of a gene suppressing angiogenesis.

The collected Paramyxovirus can be purified to be substantially pure. Purification can be carried out by a known purification/separation method such as filtration, centrifugation, and column purification, or the combination thereof. The term 25 "substantially pure" means that a virus comprises the major portion in a sample where it is present as a component. Typically, a substantially pure virus vector in a sample can be confirmed when protein derived from the virus vector occupies 50% or more, preferably 70% or more, more preferably 80% or more, yet more 30 preferably 90% or more, of the total proteins in the sample. Exemplary purification methods specific for Paramyxovirus include methods using cellulose sulfuric ester or cross-linked polysaccharide sulfuric ester (Examined Published Japanese Patent Application No. (JP-B) Sho 62-30752; JP-B Sho 62-33879; and JP-B Sho 35 62-30753), and methods which comprise allowing polysaccharide

comprising fucose sulphuric acid and/or its degradation product (WO 97/32010).

The Paramyxovirus vector of the present invention can be made as a composition together with a desired, pharmaceutically acceptable carrier or medium. A "pharmaceutically acceptable carrier", as defined herein, refers to those materials that can be administered with a vector and do not significantly inhibit gene transfer achieved by the vector. For instance, the Paramyxovirus vector of the present invention may be appropriately diluted with a medium such as saline and phosphate buffered saline (PBS), to prepare a composition. If the Paramyxovirus vector of the invention is propagated in chicken eggs, the composition may contain allantoic fluids. In addition, the composition may contain media such as deionized water or a 5% dextrose aqueous solution. It may further contain stabilizers, antibiotics, and such. The present invention provides a method for producing angiogenic compositions in the present invention, which comprises the step of mixing the vector of the present invention with the pharmaceutically acceptable carriers. The present invention also relates to the usage of the vectors of the present invention for producing the angiogenic compositions in the present invention. The compositions in the present invention are also useful as pharmaceutical compositions. The present invention relates to ischemia therapeutic formulations including the vectors in the present invention and pharmaceutically acceptable carriers. The present invention also relates to the use of the vectors and the compositions of the present invention as pharmaceuticals.

Angiogenic genes carried by Paramyxovirus vectors can be transferred by administering Paramyxovirus vectors constructed as described above or the compositions containing the vectors. The present invention provides the method for inducing angiogenesis , which comprises the step of administering Paramyxovirus vectors of the present invention or angiogenic compositions of the present invention. The method is especially useful to treat ischemic tissues. Although there is no limitation to the sites of administration, local administration of the transgene directly into

ischemic tissues or their surrounding areas is preferable so that expression products are concentrated in ischemic tissues and are prevented from leaking into the circulatory system. Alternatively, it is preferable to express the transgenelocally in the target tissue areas using proper gene delivery systems. For example, gene delivery can be achieved by administering Paramyxovirus vector-containing compositions of the present invention from inside or outside of ischemic tissues *in vivo* in order to express exogenous genes in the ischemic tissues. In addition, it may be achieved by *ex vivo* administration. For example, cells transfected with Paramyxovirus vectors encoding angiogenic genes can be injected into ischemic tissue areas or infused into arteries, which flow through the ischemic tissues.

Furthermore, local administration using a catheter can be selected. For example, vectors of the present invention can be administered by the double balloon catheter method, in which the vector compositions are infused into the area where the blood vessel is separated by two balloons, or by the administration method using a porous balloon (Jorgensen, B. et al., Lancet 1 (8647): 1106-8, 1989; Wolinsky, H. and Thung, S. N., J. Am Coll. Cardiol. 15 (2): 475-81, 1990; WO 93/00051; WO 93/00052). Hydrogel-coated balloons can also be used as described above (Takeshita, S. et al., Lab. Invest. 75 (4): 487-501, 1996).

For example, the vector compositions of the present invention can be directly infused into myocardium through the ventrical cavity using a catheter to treat, for example, cardiac infarction, angina, or other ischemic cardiac diseases. Moreover, angiogenesis and development of collateral circulation in the area of stenosis in the coronary artery can be promoted by local infusion of the vectors of the present invention using a catheter.

However, the use of a catheter to administer the vectors requires a relatively long period of incubation and may cause vascular injury by the balloon. Moreover, it is often difficult to insert a catheter into diffuse blood vessels in ischemic tissues. Intramuscular (IM) administration of the vectors is especially preferred for the treatment of ischemic tissues in the present

invention. Intramuscular administration is easier than administration using a catheter and the risk of damaging a blood vessel is low. The vectors of the present invention are administered into, for example, ischemic tissues or striated muscles surrounding the ischemic tissues. Striated muscles include skeletal and cardiac muscles. Bupivacaine, which is known to promote the expression of transgenes by inducing regeneration of muscles, can be administered before the administration of the virus vectors. Moreover, intradermal (ID) administration can also be selected. The vectors can be transferred into muscles, for example, subcutaneously or directly through a skin incision. It is necessary to be careful not to damage fascia during the vector transfer. For example, administration can be conducted using needles and syringes, or a bioinjector, which does not require the use of needles. Administration can be carried out either at a single place or multiple places. Moreover, administration can be carried out either once or multiple times.

The vectors of the present invention can be effectively administered in the form of a matrix. An exemplary method can be performed by dispersing virus vectors in aterocollagen matrix and solidifying the resulting mixture by freeze-drying, thereby allowing the matrix to gradually degrade. The use of this method has been reported to be useful for lasting effects of Adenovirus vectors known for their transient gene expression and of naked DNA (Ochida, T. et al., Nature Medicine 5, 707-710, 1999). The virus vectors of the present invention can be formulated with these auxiliary agents and can be freeze-dried. Moreover, a lipid cation can be added to increase the expression effect.

It is known that even a small administrative matrix can gradually release proteins such as growth factors over a long period of time through needles of approximate size of 18 gauge. For example, in the case of protein formulations are administered, the effectiveness of formulations such as a growth hormone last longer, for example, 7 days or more, than when formulations such as a growth hormone are administered alone. There is a report that the effectiveness can usually last 10 days or more (Unexamined Published

Japanese Patent Application No. (JP-A) Hei 10-001440). This method thus enables to significantly reduce the number of administrations and amount of pain suffered by patients. The formulations can be used as, for example, solid injections (such as implants), which are 5 administered subcutaneously and intramuscularly and mucous membrane absorbents such as suppositories. The shapes of the solid formulations for injection are often particle- or rod-shaped, which can be administered by injection needles. Particle shapes such as sphere shape, and rod shapes such as square and cylindrical shapes, 10 are preferred shapes for formulation.

The size of the parenteral formulation of the present invention can be chosen depending on the type of administration and any size is suitable as long as it does not cause excess pain to patients. When the injection consists of a rod-shaped matrix of, for example, 15 3 mm or less (for example, 0.1 mm to 3 mm) in diameter and 30 mm or less (for example, 0.5 mm to 30 mm) in length, preferably 1.3 mm or less (for example, 0.1 mm to 1.2 mm) in diameter and 20mm or less (for example, 0.5 mm to 20 mm) in length, which can be administered with an injection needle 14 gauge or smaller, and more preferably 20 that of 0.1 mm to 1 mm in diameter and about 1 mm to 20 mm in length. The matrix is preferably cylindrical. Moreover, when the injection contains a particle-shaped matrix, the maximum diameter must be 1 mm or less (for example, about 0.1  $\mu\text{m}$  to 1 mm), preferably, 150  $\mu\text{m}$  or less (for example, about 0.5  $\mu\text{m}$  to 100  $\mu\text{m}$ ), more preferably, about 25 1  $\mu\text{m}$  to 100  $\mu\text{m}$ . Moreover, the weight of the matrix can be chosen depending on the shape of the formulation and for injection, the weights are often 40 mg or less, preferably, 1 mg to 25 mg.

The genes transferred by the Paramyxovirus vector of the present invention are not limited as long as they promote angiogenesis and/or 30 vascularization. For example, genes encoding aFGF, FGF2 (bFGF), VEGF, Ang (including Ang-1 and Ang-2), EGF, TGF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ , PD-ECGF, PDGF, TNF- $\alpha$ , HGF, IGF, EPO, CSF, M-CSF, GM-CSF, IL-8, and NOS, as described above, are used. These proteins include each member and 35 isoform belonging to each family. One example especially suitable as an angiogenic gene, which is transferred by the Paramyxovirus vector of the present invention, is the gene encoding FGF2. FGF2

is, for example, anticipated to be applicable for acute ischemia therapy. For example, a significant therapeutic effect for acute critical ischemic limbs can be expected. Moreover, FGF2 shows a therapeutic effect for cardiac infarction (Yanagisawa-Miwa, A. et al., Science 257 (5075): 1401-3, 1992). Proteins can be a secretory protein, a membrane protein, a cytoplasmic protein, or a nuclear protein. Preferably, a secretory protein is used. Moreover, proteins may be artificially synthesized. Examples of artificially synthesized proteins are fusion proteins with other proteins, dominant negative proteins (including soluble molecules of receptors or membrane-binding dominant negative receptors), deficient forms of cell adhesion molecules, and cell surface molecules. Moreover, proteins attached to secretory signals, membrane localization signals, nuclear import signals, and such can be used. The transgenes can be endogenously induced to be expressed in ischemic tissues. It is also possible that their expressions are not induced but can be expressed at different sites. Moreover, the function of the undesired genes expressed in ischemic tissues can be suppressed by expression of antisense RNA molecules or RNA cleaving ribozymes.

The vectors of the present invention are expected to be applicable for gene therapy to treat various ischemic diseases as well as diseases that are treatable by angiogenesis. Such gene therapy includes, for example, the treatment for ischemia caused by vascular sever, infarction, and hemostatis due to vascular dissociation. The ischemic diseases treatable by the vectors of the present invention are, for example, cerebrovascular ischemia, kidney ischemia, lung ischemia, limb ischemia, ischemic cardiomyopathy, and myocardial ischemia. Tissues that are applicable for gene therapy are not specifically limited and, for example, muscles, brains, kidneys, and lungs can be used. Moreover, it is effective for promoting angiogenesis in transplants. Furthermore, it is useful for constructing various disease models and for developing or evaluating treatment methods in disease models.

Accelerated angiogenesis by vector administration can be confirmed by, for example, measuring the density and analyzing the number of capillary vessels in biopsy samples, and images by

angiography. Moreover, it can also be confirmed by blood flow analysis using Doppler perfusion image analysis. The treatment effect on ischemic tissues is confirmed by macroscopic observation of tissue necrosis or tissue amputation or the microscopic observation of tissue samples.

Paramyxovirus vectors of the present invention are administered into target tissues at pharmaceutically effective doses and, thus, the vectors are transferred into the cells of the target tissues. "Pharmaceutically effective dose" means an amount of genes to be introduced into the cells of the target tissues, which achieves the preferable treatment effect or disease prevention effect at least partially. Angiogenic factors are produced from the cells, to which the vectors are transferred, by administering an effective dose of Paramyxovirus vectors of the present invention containing the desired angiogenic genes. Preferably, significant levels of angiogenic factors are detected in the tissues where the effective dose of the vectors of the present invention containing the desired angiogenic genes are administered. The phrase "significant level" indicates that the amount of expression (amount of transcription and translation products) of the genes transferred by the vectors of the present invention is detectable. For example, it indicates that the maximum expression level of the transferred gene is significantly enhanced as compared to the expression level of the endogenous gene when an endogenous gene corresponding to the transgene exists. Preferably, the expression level of the angiogenic genes at the site of administration is 1.2 times or more greater than the expression level of the endogenous gene, preferably 1.5 times or more, more preferably 2 times or more, even more preferably 10 times or more, and most preferably 20 times or more. However, the expression level of the transgene should be decided by considering the effective expression dose and toxic levels.

The expression level of the transgenes in the cells can be assayed by methods well known to those in the art. The transcriptional products of the genes can be detected and quantified by the methods such as, Northern hybridization, RT-PCR, and RNA protection assay. *In situ* detection can be performed by methods such

as Northern hybridization and RT-PCR. Western blotting, Immuno precipitation, RIA, ELISA, Pull-down assays, and such, using antibodies, can be performed to detect translational products. Moreover, to make the detection of expression products of the transgene easier, tags can be attached to the expressed protein or reporter genes can be inserted such that the reporter genes are expressed. Examples of reporter genes include, without limitation,  $\beta$ -galactosidase, chloramphenicol acetyl transferase (CAT), alkaline phosphatase, and green fluorescence protein (GFP) genes.

A dose of the vector may vary depending on the disease, the body weight, age, sex, symptom, the purpose of administration, the transgene, and such, but it can be appropriately determined by those skilled in the art. The dose of the vector may be preferably within the range of about  $10^5$  cell-infectious units (CIU)/ml to about  $10^{11}$  CIU/ml, and more preferably about  $10^7$  CIU/ml to about  $10^9$  CIU/ml, but most preferably about  $1 \times 10^8$  CIU/ml to about  $5 \times 10^8$  CIU/ml, with pharmaceutically acceptable carriers. The composition of the present invention comprising the virus may be administered into subjects including all mammalian animals including humans, monkeys, mice, rats, rabbits, sheep, cattle, and dogs.

The dose for humans is preferably within the range of  $2 \times 10^8$  CIU to  $2 \times 10^{10}$  CIU in general for each administration site, more preferably, a dose of around  $2 \times 10^9$  CIU, for example, within the range of  $5 \times 10^8$  CIU to  $1 \times 10^{10}$  CIU. The frequency of administration is once or more times within the range of clinically acceptable side effects. The frequency of the administration per day is the same. For non-human animals, for example, administration can be done by increasing or decreasing the number of administration sites or by calculating the doses based on the weight ratio of human to the target animals or the weight ratio or volume ratio of target sites (such as ischemic tissues).

#### Brief Description of the Drawings

Fig. 1 is a schematic representation of operative procedures for moderate (left panel) and severe (right panel) acute hind limb

ischemia of mice. Branched lines indicate arteries and veins in hind limb. Short thick lines indicate excisional sites of vessels.

Fig. 2 is graphs showing hind limb ischemia-related expression of endogenous VEGF (solid) and FGF2 (hollow) in muscle (left graph) and serum (right graph). Moderate and severe ischemia models of C57BL/6 mice were used. Two days after operation, all thigh and calf muscles ( $n=6$ ) and serum ( $n=6$ ) were obtained, and subjected to enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA). Values were standardized by total extracted protein of muscle or volume, respectively, and expressed with mean  $\pm$  S.D. Values of muscle contains both data of thigh and calf (i.e.,  $n=12$  in each group). Mean values are shown in the graph. \* $P < 0.01$ , # $P < 0.05$  (analyzed by one-way ANOVA).

Fig. 3 is a photograph showing the result of RT-PCR for detecting induction of VEGF expression due to ischemia.

Fig. 4 graphs showing expression level (left) and its time course change (right) of SeV-mediated firefly luciferase gene transferred into muscles. Luciferase activities are examined in the untreated group, the pCMV-luc (100  $\mu$ g)-administered group, and the SeV-luc ( $10^7$  pfu or  $10^8$  pfu)-administered group, using moderate ischemia model of C57BL/6 mice (left). The right panel shows the time course changes of the expression level of luciferase gene transferred in the moderate ischemic model. White circles indicate the of pCMV-luc (100  $\mu$ g)- administered C57BL/6 mouse group. Black circles indicate the SeV-luc ( $10^8$  pfu)-administered C57BL/6 mouse group. Shaded circles indicate the SeV-luc ( $10^8$  pfu)-administered BALB/c nu/nu mouse group. Thick line indicates the cut off-values, above which the expression of the transgene becomes significant. The level of gene expression in each graph is represented in the same log scale.

Fig. 5 is a graph showing the secretion level of angiogenic protein in human umbilical vein endothelial cells (HUVEC), COS7 cells, bovine vascular smooth muscle cells (BSMC), and cardiomyoblast cells (H9C2). "Basal release" indicates the production amount of each factor without the vectors. "Cut-off

value" indicates the level above which the expression of the transgene becomes significant.

Fig. 6 is graphs showing *in vivo* expression of exogenously transferred FGF2 (a) and VEGF (b) gene in muscle (left) and serum (right) of moderate ischemic limb of C57BL/6 mice. Soon after the operative procedure, 50  $\mu$ l of each vector solution was injected to thigh and calf muscles. Two days after operation, all thigh and calf muscles (n= 6, each) and serum (n= 6) were obtained, and subjected to ELISA for murine FGF2 (a) and, murine and human VEGF (b), respectively. Values were standardized by total extracted protein or total volume of muscle and expressed with mean  $\pm$  S.D. Mean values are shown in the figure. Note that the scales are in log scale.

Fig. 7 is graphs showing gene transfer-mediated enhancement of endogenous murine VEGF expression in limb muscles of C57BL/6 mice without operation (left), with moderate ischemia (middle), and severe ischemia (right). Soon after the operative procedure, 50  $\mu$ l of each vector solution was injected to thigh and calf muscles. Two days after operation, all thigh and calf muscles and serum (n= 6 each, total n= 12) were obtained, and subjected to ELISA for murine VEGF. Values were standardized by total extracted protein of muscle, and expressed with mean  $\pm$  S.D. Mean values are shown in the figure. \*P <0.01, #P <0.05 (analyzed by one-way ANOVA).

Fig. 8 is photographs showing tissue images of gene-transferred mouse limb muscles. Histological observation was carried out 2 days after severe ischemia operation for C57BL/6 mice, which were then treated as described in the description of Fig. 7. Apparent inflammatory infiltrate and stromal edema can be seen in mock transfected (SeV-luciferase; mock) thigh muscle (upper right), compared to untreated animal (upper left; no ischemia). Severe damage of muscle fibers, intracellular edema, and inflammatory infiltrate can be seen in VEGF165-treated animals (bottom left; VEGF165). These damages are inhibited by FGF2 gene transfer (bottom right; FGF2). Each group contains 6 animals and shows similar results. Hematoxylin-eosin staining. Original magnification x200.

Fig. 9 is photographs showing therapeutic or adverse effects of exogenously transferred angiogenic factor genes in muscles of

severe limb ischemia mice 10 days after operation for left hind limbs. Each photograph simultaneously shows limb salvage score (LSS). Upper panels show typical adverse effect in severe ischemia model of C57BL/6 mice (limb salvage model). VEGF165-transferred mouse 5 demonstrated complete limb amputation (upper middle panel), while control mouse with luciferase (upper left panel) and FGF2-treated mouse (upper right panel) indicated salvaged limbs. Lower panels show typical therapeutic effect in severe ischemia model of BALB/c nu/nu mice (auto-amputation model). FGF2-treated mouse demonstrated 10 limb salvage (bottom right panel), while control mouse with luciferase (bottom left panel) and VEGF165-treated mouse (bottom right panel) indicated almost complete loss of hind limbs.

Fig. 10 is graphs showing limb prognosis curve in vector-administered limb salvage and auto-amputation models. The 15 graphs show the rate (limb salvage rate) of vector-administered animals retaining limb. As a result of intramuscular transfer of angiogenic genes, A shows adverse effects of VEGF165 in severe ischemia model of C57BL/6 mice (limb salvage model) and B shows therapeutic effects of FGF2 in severe ischemia model of BALB/c nu/nu mice (auto-amputation model). Each group was subjected to 3 separate 20 experiments (n= 10). Curve was described by Kaplan-Mayer's method, and data was analyzed with log-rank test. \*P <0.0001.

Fig. 11 is photographs showing *in vivo* angiogenic effect in C57BL/6 mice with severe hind limb ischemia (limb salvage model) 25 measured with a laser Doppler perfusion image analyzer. Recovery of blood perfusion was observed in the mice treated with SeV-luciferase, SeV-VEGF165, and SeV-FGF2 at 10<sup>7</sup> pfu. Each group shows the time course of same animal. Upper panels show typical results of time course of blood flow recovery in mouse treated with 30 SeV-luciferase (mock transfection). Blood reperfusion of thigh muscle was recognized around 4 days after intervention, and was apparent at day 7. At day 10, however, no clear perfusion at calf level was hard to be detected, resulting in limb atrophy with a sign of toe necrosis (rightmost panel). Middle panels show typical time 35 course of mouse withSeV-VEGF165. No apparent and significant reperfusion was recognized in thigh and calf during observation,

resulting autoamputation of the limb (rightmost panel). Lower panels show typical time course of mouse -treated with SeV-FGF2. Apparent reperfusion at the thigh level was clearly seen until day 4, and significant blood flow was recognized in whole limb until day 10, 5 resulting in complete limb salvage (rightmost panel).

Fig. 12 is a graph showing the recovery of blood perfusion by angiogenic gene therapy in C57BL/6 mice with severe ischemia (limb salvage model). The average blood perfusion in the ischemic limb and control limb treated as in the description of Fig. 11 was 10 calculated to give the blood perfusion value ratio of left limb (ischemic)/ right limb (control). \*P<0.001 (compared with all other groups), #p <0.05 (compared with all other groups), ##p <0.05 [compared with non-administered (mock) group].

Fig. 13 is a graph showing time course change in limb salvage 15 ratios in mouse severe ischemia models (auto-amputation model) to which the F gene-deficient SeV vector containing the hFGF2 gene or replicative SeV vector containing the hFGF2 gene. In the figure, the number of subjects (n) and the dose of vectors are shown.

20 Best Mode for Carrying out the Invention

The present invention is specifically illustrated below with reference to Examples, but it is not to be construed as being limited thereto. Furthermore, the references cited throughout this description are incorporated herein by reference.

25 Recombinant SeV was prepared as described previously (Yu, D. et al., Genes Cells 2(7): 457-66, 1997; Yonemitsu, Y., et al., Nature Biotech. 18, 970-973 (2000); Kato, A., et al., Genes Cells 1, 569-579 (1996); Hasan, M. K., et al., J. Gen. Virol. 78, 2813-2820 (1997)).

30 Virus titer was determined by hemagglutination assay using chicken red blood cells, and high titer stock ( $10^9$  pfu/ml) was kept at -80°C until use. Human VEGF165 cDNA was isolated by RT-PCR as described previously (Yonemitsu, Y., et al., Lab. Invest. 75, 313-323 (1996)). Full-length mouse FGF2 cDNA was prepared by PCR using partial sequence of the cDNA (Imamura, T., et al., Science 249, 35 1567-1570 (1990)) donated from Dr. Imamura (National Institute of Bioscience and Human-Technology, Tsukuba, Japan). Specifically, the

full-length cDNA was amplified using a partial mouse FGF2 cDNA fragment (a fragment of position 7 to 435 nucleotide of Accession Number M30644), which is missing the start and stop codon regions as a template, and N-terminus primer (5'-  
5' ACGTGCGGCCGCCAAAGTTCATCCACCATGGCTGCCAGCGGCATCACCTCGCTTCCC -3'  
/SEQ ID NO: 15) containing the start codon of mouse FGF2 cDNA and C-terminus primer (5'-  
ACGTGCGGCCGCGATGAACCTTCACCCATAAGTTTCTTACTACGCGGATCAGCTCTAGCAGA  
CATTGGAAGAACAGTATGGCCTCTGTCCAGGTCCCGT -3' /SEQ ID NO: 16)  
10 containing the stop codon and SeV specific sequence. The human VEGF165 and mouse FGF2 cDNAs, prepared as described above, were cloned into pSeV18<sup>+b</sup>(+) (Hasan, M. K. et al., 1997, J. General Virology 78: 2813-2820) at a NotI site after each nucleotide sequence was confirmed. Sendai virus vectors, which express human VEGF165  
15 or mouse FGF2, were referred to as SeV-VEGF165 or SeV-FGF2, respectively. SeV-luciferase (Hasan, M. K. et al., J. Gen. Virol. 78 (Pt 11): 2813-2820, 1997; Yonemitsu, Y. et al., Nature Biotechnol. 18: 970-973, 2000) and pCMV-luciferase (Yonemitsu, Y. et al., Nature Biotechnol. 18: 970-973, 2000) were prepared as described above.

20 All data of Examples of the present invention were represented as mean ± S.D. in statistical analysis. The data except that of limb salvage were analyzed by one-way ANOVA with Scheffe's adjustment. For limb salvage, rate expressed by limb salvage score (LSS) was analyzed by Kaplan-Mayer's method. The statistical significance of  
25 the limb salvage experiments was determined using the log-rank test and p <0.05 was considered as significant in all statistical analyses.

The present invention provides the basic technology for gene therapy that targets ischemic tissues. Angiogenesis in the ischemic  
30 tissues can be effectively induced and necrosis can be prevented by using the gene transfer of the present invention.

[Example 1]

Ischemia-induced endogenous VEGF expression does not contribute to  
35 local protein accumulation in hind limb muscle

To assess the therapeutic and adverse effects of angiogenic factors, the present inventors established following 3 models of limb ischemia by 2 different operations (Fig. 1): (1) moderate limb ischemia model of C57BL/6 mice in which whole femoral artery and vein, and saphenous arteries and vein have been excised (Fig. 1 left panel) (Couffinhal, T., et al., Am. J. Pathol. 152, 1667-1679 (1998); Kalka, C., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97, 3422-3427 (2000)); (2) severe ischemia model of C57BL/6 mice in which whole external iliac artery and vein, femoral artery and vein, and all related branches have been excised (Fig. 1 right panel); and (3) immune deficient BALB/c nu/nu mice subjected to same surgical procedures as (2) (i.e., severe ischemia model of BALB/c nu/nu mice).

Adult male C57BL/6, BALB/c, and BALB/c nu/nu mice (6-8 weeks old, Charles River Grade) were purchased from KBT Oriental Co. Ltd. (Tosu, Saga, Japan). Animal experiments were performed using approved protocols and in accordance with recommendations for the proper care and use of laboratory animals by the Committee for Animals', Recombinant DNA, and Infectious Pathogens' Experiments at Kyushu University and were done according to the law (No. 105) and Notification (No. 6) of the Japanese Government and "Principles of Laboratory Animal Care" and "Guide for the Care and Use of Laboratory Animals" by National Institute of Health of USA (publication No. NIH 80-23, revised 1985).

Under sufficient anesthesia using intraperitoneal injection of pentobarbital, mice were subjected to skin incision. For the moderate ischemia model, whole superficial femoral artery and vein and saphenous artery and vein (from just below of deep femoral arteries to popliteal artery and vein) was ligated, cut, and removed (Fig. 1, left panel) (Couffinhal, T., et al., Am. J. Pathol. 152, 1667-1679 (1998); Kalka, C., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97, 3422-3427 (2000)). For the severe ischemia model, additional excision of external iliac artery and vein with deep femoral artery were also made (Fig. 1, right panel). Reproducibility of limb prognosis of these models were confirmed by the 3 to 5 separate experiments using 10 or more animals/model by same operator (I. M.).

Each limb salvage experiments contained animals subjected to 4 individually separate experimentss.

The model (1) as described above never lost their limbs, occasionally showing only a sign of toe necrosis. Further, the model 5 (2) (severe ischemia model of C57BL/6 mice) did not show limb necrosis (called "limb salvage model") and all animals of the model (3) (severe ischemia model of BALB/c nu/nu mice) resulted in nearly total limb amputation within 10 days after operation (called "auto-amputation model"). The severe ischemia model of immunocompetent BALB/c mice 10 also showed similar degree of limb necrosis to BALB/c nu/nu mice (data not shown). Together with a previous report indicating that BALB/c mice are more susceptible to angiogenesis against growth factors than C57BL/6 mice (Rohan, M. R. et al., FASEB J. 14, 871-876 (2000)), these results suggests that limb salvage in C57BL/6 mice seems to be depend 15 rather on better collateral limb circulation than on susceptibility to angiogenesis.

The present inventors assessed the endogenous expression of VEGF and FGF2 in the ischemic muscle and serum of the moderate and severe ischemia model as described above. Two days after operation, 20 each limb muscle (whole thigh and calf muscle) and serum of C57BL/6 mice were collected, and their tissues are homogenized or lysated, and then subjected to enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Recombinant proteins were synthesized using Quantikine Immunoassay systems (R & D Systems Inc., Minneapolis, MN) for human VEGF or mouse 25 FGF2, and then quantified according to its instruction. The concentrations of total proteins were determined by Bradford method using protein assay system (Bio-Rad Laboratories, Hertfordshire, UK) and standardized (Yonemitsu, Y., et al., Nature Biotech. 18, 970-973 (2000)).

30 Since there were no significant differences in protein concentration between thigh and calf muscles, both were included in each group. Interestingly, ischemic operation significantly enhanced FGF2 protein content in both hind limb ischemia model mice (the moderate model,  $847.5 \pm 187.7$  pg/g muscle; the severe model, 35  $895.4 \pm 209.5$  pg/g muscle; each n= 12), compared to baseline ( $489.7 \pm 108.6$  pg/g muscle; n= 12) for untreated mice ( $P < 0.001$ ) (Fig. 2).

On the other hand, ischemia-related enhancement of VEGF expression was seen in the severe ischemic group, but not significant in the muscles (Untreated,  $174.7 \pm 43.1$ ; Moderate,  $119.2 \pm 53.4$ ; and Severe,  $242.5 \pm 244.3$ , n= 12). These seemed paradoxical results because VEGF 5 is a well-known mitogen strongly induced by tissue ischemia (Shweiki, D. et al., Nature 359, 843-845 (1992); Forsythe, J. A., et al., Mol. Cell. Biol. 16, 4604-4613 (1996)). The present inventors measured VEGF level in serum since VEGF may leaked to systemic circulation. As expected, severity-dependent increase of VEGF protein level in 10 serum was observed, while FGF2 level in serum could not be detected (Fig. 2, right panel):

The present inventors hypothesized that limb ischemia may induce rather smaller isoforms of VEGF which is well-known less to interact to heparin sulfate than medium- or larger- sized VEGF (Cohen, 15 T., et al., J. Biol. Chem. 270, 11322-11326 (1995)). To assess this hypothesis, the present inventors analyzed expression of VEGF isoforms in thigh muscle of C57BL/6 male mice a day after operation. The analysis was performed by RT-PCR using primer sets which can differentiate murine VEGF splicing isoforms including VEGF188, 164, 20 144, and 120 (Burchardt, M., et al., Biol. Reproduct. 60, 398-404 (1999)). Primer sets were previously reported (Burchardt, M., et al., Biol. Reproduct. 60, 398-404 (1999)) for rat VEGF on exon 1 and exon 8: forward primer (5'- TGC ACC CAC GAC AGA AGG GGA -3' /SEQ ID NO: 17) and reverse primer (5'- TCA CCG CCT TGG CTT GTC ACA T -3' /SEQ 25 ID NO: 18), which correspond to sequences of murine VEGF isoforms. For detecting smallest isoform of murine VEGF (VEGF115), same forward primer as above and VEGF115-specific reverse primer (5'- CTA CCA AAA GTT TCC CAG.GCA G -3' /SEQ ID NO: 19) were used (Sugihara, T. et al., J. Biol. Chem. 273, 3033-3038 (1998)). RT-PCR was performed under 30 conditions according to literatures (Burchardt, M., et al., Biol. Reproduct. 60, 398-404 (1999); Sugihara, T. et al., J. Biol. Chem. 273, 3033-3038 (1998)).

As a result, ischemia-related endogenous VEGF expression was seen only in 164 isoform, while no apparent other isoforms' 35 expression was detected (Fig. 3). Additional RT-PCR analysis cannot

detect the expression of a known smallest isoform, VEGF115 (Sugihara, T. et al., J. Biol. Chem. 273, 3033-3038 (1998)).

[Example 2]

- 5 Kinetics of recombinant Sendai virus-mediated intramuscular gene transfer to mouse hind limb

For the kinetic study, the present inventors assessed levels and time course of transgene expression using firefly luciferase. Luciferase assay was carried out using a luminometer (Model LB 9507, 10 EG&G Berthold, Germany) according to literature (Yonemitsu, Y., et al., Nature Biotech. 18, 970-973 (2000)). The data are represented as relative light units (RLU)/mg protein. The concentrations of total proteins were determined by Bradford method using a protein assay system (Bio-Rad Laboratories, Hertfordshire, UK) and were used 15 for standardizing the value obtained by luciferase assay. Since limb muscle of severe limb ischemia model was apparently damaged, suggesting reduced transgene expression, moderate ischemia model (Fig. 1, left panel) were used for analysis. The gene (25 µl) was transferred to two sites, thigh and lower thigh muscles at the time 20 of operation. Doses described herein below are the sum of the doses at two sites. Mice (C57BL/6 mice) that received 100 µg of pCMV-luciferase (about 50 times higher than clinical dose) (Baumgartner, I., et al., Circulation 97, 1114-1123 (1998); Isner, J. M. et al., J. Vasc. Surg. 28, 964-973 (1998)) showed relatively 25 high luciferase activity (mean ± S.D. =  $5.1 \pm 3.9 \times 10^6$  RLU/mg protein, n= 6) 2 days after gene transfer, while approximately 5-times ( $2.4 \pm 3.8 \times 10^7$  RLU/mg protein, n= 12) and 120- times ( $7.3 \pm 4.7 \times 10^8$  RLU/mg protein, n= 6) higher expressions were observed in mice that received SeV-luciferase at  $10^7$  Plaque forming units (pfu) and SeV at  $10^8$  pfu, 30 respectively. Further, time course of transgene expression was analyzed using moderate ischemia model of C57BL/6 mice that received luciferase expression plasmid (pCMV-luc) or SeV-luc in the same manner as described above. The moderate ischemia model of C57BL/6 mice that received intramuscular injection of  $10^8$  pfu of 35 SeV-luciferase also showed decline of the expression in time-dependent manner (day 2:  $7.3 \pm 4.3 \times 10^8$  RLU/mg protein, n= 12;

day 7:  $3.4 \pm 4.7 \times 10^7$  RLU/mg protein, n= 12; and day 14:  $2.6 \pm 1.2 \times 10^4$  RLU/mg protein, n= 12) (Fig. 4, right panel). Although time course of luciferase activity in the moderate ischemia model of immuno-deficient BALB/c nu/nu mice, to which  $10^8$  pfu of SeV-luciferase were intramuscularly administered, was similar to those of the C57BL/6 mice until day 7, the mice kept its expression level later (day 2:  $9.4 \pm 3.7 \times 10^8$  RLU/mg protein, n= 12; day 7:  $1.3 \pm 1.9 \times 10^7$  RLU/mg protein, n= 12; and day 14:  $0.9 \pm 1.3 \times 10^7$  RLU/mg protein, n= 12).

Next, the present inventors assessed secretion of angiogenic proteins *in vitro* using various culture cells including not only muscular cells such as primary bovine smooth muscle cells (BSMCs) and cardiomyoblasts (H9C2), but also primary human umbilical vein endothelial cells (HUVECs), and COS7 cells. FGF2 vector (SeV-FGF2) which contains no classical signal sequences for secreting proteins was used in the present invention because previous studies by the present inventors and others demonstrated that FGF2 without secreting sequences could be expressed extracellularly (Piotrowicz, R. S. et al., J. Biol. Chem. 272, 7042-7047 (1997); Qu, Z., et al., J. Histochem. Cytochem. 46, 1119-1128 (1998); Florkiewicz, R. Z. et al., J. Cell. Physiol. 162, 388-399 (1995)). As expected, the effective secretion of FGF2 protein into the culture medium could be detected as similar levels of VEGF165 in dose-dependent manner (for example, at MOI= 100: VEGF165 vs FGF2=  $4,354 \pm 2,794$  vs  $3,682 \pm 1,063$  in HUVEC,  $275 \pm 58$  vs  $398 \pm 154$  in BSMC,  $16,987 \pm 4,748$  vs  $5,976 \pm 381$  in H9C2, and  $38,648 \pm 4,913$  vs  $1,547,237 \pm 176,502$  in COS7 cells, pg/ $10^5$  cells/24 hours, n= 3, respectively) (Fig. 5).

[Example 3]

Kinetics of SeV-mediated intramuscular expression of angiogenic factors *in vivo*

The present inventors' examined the expression level of angiogenic factors in muscle after *in vivo* intramuscular administration of SeV-VEGF165 and SeV-FGF2 into moderate ischemia model of C57BL/6 mice. Each 25  $\mu$ l administration was performed once

into the thigh and calf muscles, during operation, using a 26-gauge needle.

Interesting results were obtained for *in vivo* expression of angiogenic factors compared to their *in vitro* expression and *in vivo* expression of the reporter gene. As shown in Fig. 6, SeV-FGF2-mediated protein synthesis increased in dose-dependent manner reaching 100-fold greater than endogenous gene expression at highest titer (basal line,  $429 \pm 79$ , ischemia,  $974 \pm 150$ ,  $10^6$  pfu,  $4,913 \pm 313$ ,  $10^7$  pfu,  $13,469 \pm 12,611$ , and  $10^8$  pfu,  $46,703 \pm 12,092$  pg/g muscle, n= 6 each in thigh muscle; basal line,  $550 \pm 104$ , ischemia,  $720 \pm 128$ ,  $10^6$  pfu,  $1,376 \pm 158$ ,  $10^7$  pfu,  $8,252 \pm 8,190$ , and  $10^8$  pfu,  $59,704 \pm 35,297$  pg/g muscle, n= 6 each in calf muscle). Significant serum FGF2 could not be detected even at highest titer in all animals received SeV-FGF2. On the other hand, dose-dependent increase of VEGF165 was far less than that of FGF2 and did not reach to 2-fold of it at  $10^7$  pfu, and inversely, expression of SeV-derived human VEGF165 protein was almost undetectable at  $10^8$  pfu (basal line,  $176 \pm 44$ , ischemia,  $143 \pm 64$ ,  $10^6$  pfu,  $159 \pm 67$ ,  $10^7$  pfu,  $224 \pm 216$ , and  $10^8$  pfu, <5 pg/g muscle, n= 6 each in thigh muscle; basal line,  $173 \pm 45$ , ischemia,  $95 \pm 28$ ,  $10^6$  pfu,  $186 \pm 30$ ,  $10^7$  pfu,  $172 \pm 101$ , and  $10^8$  pfu, <5 pg/g muscle, n= 6 each in calf muscle). Although serum level of endogenous murine VEGF was significantly increased by moderate limb ischemia ( $37.7 \pm 15.4$  pg/ml, n= 6), vector-derived human VEGF165 could not be significantly detected, suggesting that intramuscularly expressed VEGF165 did not diffuse to the systemic circulation.

[Example 4]

Ischemia-induced endogenous VEGF expression is markedly enhanced by angiogenic gene transfer

The present inventors hypothesized that incomparable expression pattern between VEGF165 and FGF2 is due to endogenous VEGF expression. Overexpression of endogenous VEGF165 may exacerbate tissue ischemia via too much stronger permeability action, and may downregulate the SeV-dependent transcription. Further, a previous report indicated that the angiogenic activity of FGF2 was partly due

to enhanced endogenous VEGF expression *in vitro* and *in vivo* (Asahara, T., et al., Circulation 92, 365-371 (1995)). Thus, the present inventors assessed modulation of endogenous murine VEGF protein synthesis in muscles via exogenously transduced angiogenic factor genes using murine-VEGF specific ELISA system. As shown in Fig. 7, transfer of FGF2 gene, but not VEGF165 gene, significantly enhanced endogenous murine VEGF levels in muscles in both limb conditions such as normal circulation (no operation) and moderate ischemia. In case of severe limb ischemia, gene transfer of both angiogenic factors, dramatically enhanced endogenous murine VEGF expression, and in particular, VEGF165 resulted in around 7-fold higher than that of ischemia itself (Mock).

To assess these further, the present inventors histologically observed effects of gene transfer of angiogenic factors in C57BL/6 severe ischemia model (Fig. 8). Ischemic operation followed by mock transfection (Mock) demonstrated diffusely picnotic muscle fibers associating intracellular edema and inflammatory infiltrate 2 days later. These findings were markedly enhanced by VEGF165 gene transfer, while apparently inhibited by FGF2 gene transfer (Fig. 8).

20

[Example 5]

Exogenously transduced VEGF165 acts as a limb damaging factor rather than limb salvaging factor in acute severe limb ischemia

Based on findings as described above, the present inventors tested therapeutic effects of *in vivo* gene transfer of angiogenic factors using both moderate and severe ischemic limb models. The present inventors used viruses at  $10^7$  pfu for observing *in vivo* therapeutic effect, because VEGF165 at highest dose of  $10^8$  pfu could not produce transgene products as shown above. The present inventors categorized the degree of limb necrosis for 4 salvage scores (Limb Salvage Score: LSS): LSS= 4, complete limb salvage; LSS= 3, limb necrosis below heel; LSS= 2, limb necrosis below knee; LSS= 1, limb necrosis above knee; and LSS= 0, total limb amputation around the inguinal ligament. According to this classification, the present inventors firstly tested the toxicity of SeV-mediated expression of angiogenic factors using limb salvage model of C57BL/6 mice under

. severe limb ischemia. The angiogenic genes were transferred in the same manner as in Example 2.

Mice of all groups completely maintained their limbs when vectors were injected thereto two days before ischemia operation.

5 Mice of all groups including FGF2-administered group, except VEGF165-administered group, showed complete limb salvage (%LLS= 100%) when vector was injected at the period of operation. As shown in Fig. 9 and 10, however, some mice that received VEGF165 lost their limbs (5/10 mice lost their limbs, %LLS= 52.5%, p <0.0001 compared  
10 to other groups) (Fig. 10A). These results suggest limb-damaging effect of VEGF165 gene transfer. Next, the effect of gene therapy with angiogenic genes was analyzed using severe ischemia model (auto-amputation model) of BALB/c nu/nu mice. As a result, administration of SeV-VEGF165 could not improve hind limb prognosis  
15 (8/10 lost limbs, %LLS= 15.0%) similar to that of luciferase-expressing SeV (5/6 lost limbs, %LLS= 16.7%), while administration of SeV-FGF2 significantly inhibited limb amputation in nu/nu mice (2/10 lost limbs, %LLS= 77.5%) (Fig. 10B). This indicates apparent limb salvage effect of FGF2 gene transfer.

20 Subsequently, the present inventors determined the effect of intramuscular gene transfer of the recovery of blood perfusion in left limbs subjected to severe ischemia operations, by laser Doppler perfusion image analysis (Couffinhal, T., et al., Am. J. Pathol. 152, 1667-1679 (1998); Murohara, T., et al., J. Clin. Invest. 105,  
25 1527-1536 (2000)). Severe ischemia model (limb salvage model) of C57BL/6 mice were subjected to gene transfer under the same conditions as in the description of Fig. 10A (limb salvage model). Measurements of the ischemic (left) /normal (right) limb blood flow ratio using a laser Doppler perfusion image (LDPI) analyzer (Moor  
30 Instruments, Devon, UK) were performed as described previously (Couffinhal, T., et al., Am. J. Pathol. 152, 1667-1679 (1998); Murohara, T., et al., J. Clin. Invest. 105, 1527-1536 (2000)). Specifically, mice were placed on a heating plate kept at 37°C to minimize data variations due to body temperature before  
35 initiating laser scanning. At predetermined time points (before operation and on postoperative days 2, 4, 7, and 10), two consecutive

scans were performed over the same region of interest (legs and feet) in each animal (Fig. 11). No essential difference between the two scans was found. After laser scanning, the stored images were subjected to computer-assisted quantification of blood flow, and the average flow of the ischemic and non-ischemic feet were calculated. To minimize data variables due to ambient light and temperature, the LDPI index was expressed as the ratio of left (ischemic) to right (non-ischemic) limb blood flow.

In both mice with SeV-luciferase (Mock) and SeV-FGF2, apparently blood perfusion was detected around upper thigh at day 4, and particularly, significant perfusion into the calf muscle was seen in the FGF-administered group at day 4, 7, and 10, compared to limited perfusion in the thigh muscle in luciferase-administered group at the same time points (Fig. 11). As representative results, some of luciferase-injected mice showed moderate atrophic limbs, while FGF2-injected mice largely showed undamaged limbs. In contrast, mice received VEGF165 revealed very low blood perfusion in thigh muscle, resulting limb amputation (Fig. 11). All mice received SeV-VEGF165 had lost their limbs at least knee level. The observation results of limb blood perfusion in each administration group are described below.

#### 1. SeV-luciferase-administered individuals

Blood perfusion in the left lower limb was hardly observed immediately after operation. Blood perfusion was gradually recovered and by 4 days after operation it was recovered up to approximately the middle of the femoral region. However, blood perfusion into the lower thigh had not recovered by 10 days after operation. As a result, the lower limb did not have necrosis but showed atrophy to some extent as shown in the rightmost panel. The same result was observed in one third of the individuals. Some individuals showed better recovery than other individuals did as described above.

#### 35 2. SeV-VEGF165-administered individualised

As described above, most of the blood perfusion was diminished right after operation. Further periodical observation could hardly find the recovery of blood perfusion in the femoral region. As a result, the lower limb from middle of the femoral region was 5 auto-amputated as shown in the rightmost panel. All 10 individuals showed completely the same result.

### 3. SeV-FGF2- administered individuals

As described above, most of the blood perfusion in the left lower 10 limb was diminished right after operation. The region where blood perfusion was diminished was about the same as the SeV-luciferase-administered individual. Strong blood perfusion (indicated by red spots) was observed in the femoral region at about day 4 and weak blood perfusion in the lower limb was already observed 15 at day 7. Slight but significant blood perfusion (indicated in blue) throughout the left lower limb was observed at day 10. As a result, the lower limb was maintained as it was normal in appearance as shown in the rightmost panel.

The present inventors statistically compared Doppler 20 image-based blood flow in thigh muscle of each groups. As shown in Fig. 12, mice received SeV-FGF2 showed significantly higher blood perfusion than those received SeV-luciferase with physiological recovery of limb circulation. In contrast, blood flow in thigh muscle of mice treated with SeV-VEGF165 remained low, and after 7 days post 25 operation many of them lost their limbs at least knee level.

#### [Example 6]

Therapy of acute ischemic limb using replication ability-deficient Sendai virus vector

30 1. Construction of F gene-deficient Sendai virus genome cDNA containing angiogenic genes

First, amplification of the EGFP gene was performed by PCR to construct the plasmid (pSeV18<sup>+</sup>/ΔF-GFP) containing the EGFP gene at the F gene-deficient site in the plasmid pSeV18<sup>+</sup>/ΔF (see WO00/70055 35 and WO00/70070), which was prepared by deleting the F gene of the plasmid pSeV18<sup>+</sup>b(+) (Hasan, M. K. et al., J. Gen. Virol. 78,

2813-2820, 1997) containing full-length Sendai virus (SeV) genomic cDNA. PCR was performed using NsiI-tailed primer (5'-atgcataatggatcggtttggcagttac /SEQ ID NO: 9) for 5' end and NgoMIV-tailed primer (5'-tgccggctattattacttgtacagctcgtc /SEQ ID NO: 10) for 3' end to adjust the number of nucleotides of the EGFP gene fragment to be a multiple of 6 (Hausmann, S. et al., RNA 2, 1033-1045, 1996). The PCR product was digested with restriction enzymes NsiI and NgoMIV and a fragment was recovered from a gel and subcloned into the F gene-deficient region in pUC18/dFSS between NsiI and NgoMIV and sequencing was performed for confirmation. The EGFP gene-containing DraIII fragment isolated from this vector was replaced with the DraIII fragment of pSeV18<sup>+</sup> containing the F gene, and ligated to construct pSeV18<sup>+</sup>/ΔF-GFP. However, even though the downstream ORF of the F gene is removed from pSeV18<sup>+</sup>/ΔF, the EIS sequence (SeV specific sequence, E: end, I: intergenic, S: start) of the F gene remains causing the possible expression of a 5 amino acid peptide derived from the primer which is used to connect the fragment into the vector. Moreover, since GFP is coexpressed in pSeV18<sup>+</sup>/ΔF-GFP, a vector which did not coexpress GFP and the 5-amino-acidpeptide was constructed. The recombination was performed to construct the vector as follows.

The fragment (6288 bp) containing the F gene-deficient region was recovered by digesting pSeV18<sup>+</sup>/ΔF-GFP with SalI and NheI and cloned into Litmus38 (New England Biolabs, Beverly, MA) to construct LitmusSalINheIfrg/ΔF-GFP. The deletion of the EGFP gene containing the EIS sequence located upstream of the F gene-deficient region was performed by Inverse PCR. Specifically, PCR was performed using a reverse primer (5'-gtttaccagggtggagatttgcaaccaaggcac /SEQ ID NO: 11) which was designed to contain a restriction enzyme SexAI recognition sequence in upstream of GFP gene and a forward primer (5'-cttcacctggatacaaggcacatggatgg /SEQ ID NO: 12) which was designed to contain the restriction enzyme SexAI recognition sequence in downstream of GFP gene. The desired sized fragment (10855 bp) was isolated and ligated to delete the EGFP gene containing the EIS sequence located upstream of the F gene-deficient region.

In this construct, the extra 15-bp sequence is inserted between SexAI sites due to the design of the primers. Therefore, the plasmid was prepared by transforming into *E. coli* SCS110 strain (*dcm*<sup>-</sup>/*dam*<sup>-</sup>). SCS110 strain was used because SexAI was methylated and could not be digested). Two DNA fragments, 1628 bp and 9219 bp, were recovered after digesting with SexAI, and ligated to remove the extra 15-bp fragment. Finally, LitmusSalINheIfrg/ΔF (Δ5aa) was constructed, in which the EGFP gene containing the EIS sequence located upstream of the F gene and consisting of a multiple-of-6 number of nucleotides was deleted. After the plasmid was digested with SalI and NheI, the resulting fragment was recovered, replaced with a SalI/NheI fragment which contained the F gene of pSeV 18<sup>+</sup>, and ligated to construct plasmid pSeV18<sup>+</sup>/ΔF (Δ5aa). Insertion of the angiogenic gene (for example, human FGF2 gene) into the plasmid was performed as follows using the restriction enzyme NotI recognition sequence located upstream of the NP gene.

## 2. Construction of F gene-deficient Sendai virus genome cDNA encoding hFGF2

Human FGF2 (hFGF2) cDNA was obtained by RT-PCR from vascular smooth muscle cells isolated from human great saphenous artery with the consent of the subject and thereby subcloning the PCR product into pBluescriptSK+ (Stratagene, La Jolla, CA) at HindIII (5' end) and EcoRI (3' end) sites. At the same time, the hFGF2 cDNA sequence was confirmed to be identical to the reported sequence by Abraham et al. (Abraham, J. A. et al., EMBO J. 5 (10), 2523-2528, 1986).

In order to insert the hFGF2 gene at the restriction enzyme NotI site located upstream of the NP gene in pSeV18<sup>+</sup>/ΔF (Δ5aa), a SeV specific sequence (EIS sequence) was added at the 3' end of the hFGF2 gene and the fragment containing a NotI recognition sequence at both ends was prepared. Specifically, PCR was performed using the hFGF2 cDNA described above as a template and using N-terminus primer (5'-atccgcggccgccaaagttcacttatggcagccggagcatcaccacgctgccgcctgcccggaggatggcgccagcggcgcc /SEQ ID NO: 13) containing a start codon and C-terminus primer (5'-atccgcggccgcatgaactttcacccctaagtttttactacggtcagctcttagcagacat

5 tggaagaaaaagtatgc /SEQ ID NO: 14) containing a stop codon and the EIS sequence. The PCR product was digested with NotI and then subcloned into pBluescriptSK+ (Stratagene, La Jolla, CA) at a NotI site to obtain pBS-hFGF2. The nucleotide sequence of pBS-hFGF2 was confirmed.

The fragment containing hFGF2 cDNA was obtained by digesting pBS-hFGF2 with NotI and subcloned into pSeV18<sup>+</sup>/ΔF (Δ5aa) at a NotI site located upstream of the NP gene to construct F gene-deficient Sendai virus genomic cDNA containing the hFGF2 gene, pSeV18<sup>+</sup>hFGF2/ΔF (Δ5aa) (pSeV18<sup>+</sup>hFGF2/ΔF (Δ5aa) is also indicated as pSeV18<sup>+</sup>hFGF2/ΔF). Moreover, NotI fragment containing hFGF2 cDNA was inserted at NotI site in pSeV18<sup>+</sup>b(+) encoding virus cDNA with replication ability to construct pSeV18<sup>+</sup>hFGF2. Replicative SeV vector expressing human FGF2 was prepared from pSeV18<sup>+</sup>hFGF2 by the known method (Hasan, M. K. et al., J. Gen. Virol. 78: 2813-2820, 1997; Kato, A. et al., 1997, EMBO J. 16: 578-587; Yu, D. et al., 1997, Genes Cells 2: 457-466) to construct SeV-hFGF2.

### 3. Reconstruction and amplification of F gene-deficient SeV

20 Reconstruction of F gene-deficient SeV vector using F-expressing helper cells (LLC-MK2/F; see WO00/70055 and WO00/70070) which inducibly expressed the Sendai virus F gene (SeV-F) by Cre DNA recombinase was performed (the cells before the induction of SeV-F gene expression are referred to as LLC-MK2/F and the cells after that as LLC-MK2/F/Ad). LLC-MK2 cells were seeded onto 10-cm Petri dish in diameter at 5x 10<sup>6</sup> cells/dish, incubated for 24 hours, and then transfected for 1 hour (moi= 2) with T7 RNA polymerase-expressing recombinant Vaccinia virus (Fuerst, T. R. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83, 8122-8126, 1986) which were treated with solaren and long wave ultra violet light (365 nm) for 20 min. UV Stratalinker 2400 (Catalog Number 400676 (100 V), Stratagene, La Jolla, CA, USA) equipped with five 15-watt bulbs was used for UV exposure to Vaccinia virus. Cells were then washed twice. Plasmids pSeV18<sup>+</sup>hFGF2/ΔF, pGEM/NP, pGEM/P, pGEM/L (Kato, A. et al., Genes Cells 1, 569-579, 1996), and pGEM/F-HN (WO00/70070) were resuspended in OptiMEM (GIBCO) at concentration of 12 μg, 4 μg, 2 μg, 4 μg, and 4 μg per dish,

respectively, and then mixed with SuperFect transfection reagent (1 µg DNA/5 µl of SuperFect, QIAGEN). The mixtures were left at room temperature for 15 min, mixed with 3 ml OptiMEM containing 3% FBS, and then added to the cells. The cells were incubated for 3 to 5 hours, washed with serum-free MEM twice, and further incubated in serum-free MEM containing 40 µg/ml cytosine β-D-arabinofuranoside (AraC, Sigma) and 7.5 µg/ml trypsin (GIBCO) for 24 hours.

The culture medium was removed from the cell cultures and the F-expressing helper cell LLC-MK2/F/Ad cells cloned as described above were layered on top of the cells. Specifically, LLC-MK2/F/Ad cells suspended in serum-free MEM (containing 40 µg/ml AraC and 7.5 µg/ml trypsin) were layered on top of the cells in which the culture medium had been removed, and then the cells were incubated for 48 more hours. The cells were recovered by scraper and pellets were resuspended in OptiMEM ( $10^7$  cells/ml) and freeze-thawed 3 times. This lysates (200 µl/well) were layered on top of LLC-MK2/F/Ad cells ( $4 \times 10^6$  cells/well of 12-well plate), 300 µl/well of serum-free MEM (containing 40 µg/ml AraC and 7.5 µg/ml trypsin) was added thereto, and the cells were incubated for 15 to 24 hours. The culture medium was removed and cells were washed with serum-free MEM. A fresh serum-free MEM (containing 40 µg/ml AraC and 7.5 µg/ml trypsin) was added to the cells and then incubated for 5 to 9 days, and culture medium was collected. The collected culture medium was used to infect LLC-MK2/F/Ad cells and the cells were incubated as described above in serum-free MEM (containing 40 µg/ml AraC and 7.5 µg/ml trypsin) to amplify F gene-deficient SeV.

At the same time, the culture medium containing F gene-deficient SeV particles was passed twice through a 0.22 µm filter to remove contaminating recombinant Vaccinia virus used for T7 RNA polymerase expression during the reconstruction. Specifically, the culture medium (sample after P2) amplified at least twice with serum-free MEM containing AraC (containing 40 µg/ml AraC and 7.5 µg/ml trypsin) was passed twice through a 0.22 µm filter. Furthermore, the culture medium amplified once with serum-free MEM containing AraC (containing 40 µg/ml AraC and 7.5 µg/ml trypsin) was recovered to

obtain F gene-deficient SeV (SeV-hFGF2/ΔF) which was amplified without contamination of recombinant Vaccinia virus.

4. Gene therapy for ischemic limb using replicative and  
5 non-replicative human FGF2 expression SeV vector

The present inventors assessed the treatment effect by administration of replicative and non-replicative human FGF2 expression SeV vector using severe ischemia model of BALB/c nu/nu mice (auto-amputation model) described in Example 1. Angiogenic gene transfer was carried out in the same manner as in Example 2. The vectors were injected during operation. Limb amputation after operation was observed and the limb salvage ratio (ratio of the number of individuals which kept limbs to the total number of animals) at each period was calculated (Fig. 13).

15 Control mice that received luciferase expression SeV (SeV-luciferase) showed a high limb amputation ratio, similar to the non-administered mice. In contrast, limb amputation was significantly suppressed in mice that received human FGF2 expression vector (SeV-hFGF2 and SeV-hFGF2/ΔF). This experiment revealed that 20 human FGF2-expressing Paramyxovirus vector is highly effective as an angiogenic gene transfer vector to treat ischemic diseases, and that non-replicative Paramyxovirus vector is effective for ischemia treatment.

## CLAIMS

1. A Paramyxovirus vector encoding an angiogenic gene capable of being expressed.

5 2. The Paramyxovirus vector of claim 1, wherein the angiogenic gene is fibroblast growth factor 2 (FGF2).

3. The Paramyxovirus vector of claim 1, wherein the Paramyxovirus is Sendai virus.

4. The Paramyxovirus vector of claim 1, wherein said vector  
10 lacks the F gene.

5. An angiogenic composition comprising the Paramyxovirus vector of claim 1 or a cell containing the vector, and a pharmaceutically acceptable carrier.

6. The composition of claim 5, wherein said composition is for  
15 the treatment of ischemic tissues.

7. The composition of claim 5, wherein said composition is for intramuscular administration.

8. A method for inducing angiogenesis, wherein said method comprises the step of administering the angiogenic composition of  
20 any one of claims 5 to 7.

## ABSTRACT

The present invention provides Paramyxovirus vectors encoding angiogenic genes and use of the same. The use of Paramyxovirus vectors enables effective transfer of angiogenic genes into individual tissues. FGF2 gene transferred into ischemic tissues *in vivo* induces expression of angiogenic genes without causing edema, and prevents necrosis due to ischemia. The vectors of the present invention are suitable for gene therapy targeted to ischemic tissues.